1968

René-Loïc GIRRE
DOCTEUR EN PHARMACIE (Diplôme d'État)
LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE
MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

ACIDES AMINÉS ET ALCALOÏDES

CHEZ LES PERVENCHES INDIGÈNES AU COURS DE LEUR VÉGÉTATION

RENNES
1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544724_0044

René-Loïc GIRRE
DOCTEUR EN PHARMACIE (Diplôme d'État)
LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE
MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

ACIDES AMINÉS ET ALCALOÏDES

CHEZ LES PERVENCHES INDIGÈNES AU COURS DE LEUR VÉGÉTATION

RENNES
1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE RENNES

Année 1968 N° 32

THESE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

par

René-Loïc GIRRE

né le 11 janvier 1934 à Rennes (Ille et Vilaine)
Ancien Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Rennes
Chef de Travaux à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Rennes.

Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 1968

EVOLUTION COMPAREE DE LA TENEUR EN ACIDES AMINES ET EN ALCALOIDES CHEZ LES PERVENCHES INDIGENES (*Vinca minor* L., *Vinca major* L., *Vinca media* Hoffg.-et Link.) AU COURS DE LEUR VEGETATION.

PRESIDENT : M. le Professeur M. CORMIER
MEMBRES DU JURY : M. le Professeur R. PARIS
M. le Professeur H. des ABBAYES
M. le Professeur R. TIOLLAIS
M. le Professeur P. BIGET

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE MATIERE MEDICALE ET DE BOTANIQUE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE RENNES

Année 1967 - 1968

P R O F E S S E U R S

M.M.	LEROY	Doyen	Hydro-Climatologie et Rééducation fonctionnelle.
	TIOLLAIS	Assesseur du Doyen	Chimie Pharmaceutique.
	GRANGAUD	Assesseur du Doyen	Biochimie Médicale.
	ARDOUIN		Clinique Ophtalmologique.
	BIGET		Chimie Biologique.
	BOUREL		Clinique Médicale A.
	BOURGUET		Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.
	CHAMBON		Histologie et Embryologie.
	CHAUVEL		Chimie Analytique
Mme	CHEVREL		Anatomie Pathologique.
M.M.	CORMIER.		Matière Médicale et Pharmacologie
	COUTEL		Clinique Médicale Infantile.
	DOBY		Parasitologie et Zoologie Appliquée.
	FERRAND B.		A titre personnel
	FERRAND J.		A titre personnel

M.M.	GUELFI	Physique.
	GUIHENNEUC	Clinique Chirurgicale A.
	HUGUENIN	Clinique Médicale B.
	JACQUEMIN	Hygiène et Pathologie Tropicales.
	LANCHOU	Anatomie.
	LE GAC	Biochimie Appliquée.
	LE GUYON	Hygiène et Bactériologie.
	MARUELLE	Pathologie Chirurgicale.
	MICHAUX	Médecine Légale et Médecine du Travail.
	PATAY	Physiologie.
	PECKER	Clinique Neuro-Chirurgicale.
	PELLE	Clinique Chirurcale B.
	RICHIER	Pathologie Interne et Générale.
	SABOURAUD	Neurologie et Psychiatrie.
	SAMBRON	Clinique des Maladies Infectieuses.
	SENECAL	A titre personnel
	SOURNIA	A titre personnel
	TOULOUSE	Clinique Obstétricale.
	VIVIEN	Clinique Thérapeutique.
	N	Pharmacie Galénique.

P R O F E S S E U R S S A N S C H A I R E

M.M.	GASTARD	Médecine Générale et Thérapeutique
	GOUFFAULT	Médecine générale
	NICOL	Biochimie Médicale.
	PAULET	Physiologie.
	VAN DEN DRIESSCHE	Pharmacologie.

MAITRES de CONFERENCES - AGREGES et AGREGES

M.M.	BOUGET	Physique Pharmaceutique.
	CARTIER	Maladies Infectieuses.
	CATROS	Ophtalmologie.
	CHENEBAULT	Pneumo-Phtysiologie.
	COLOMBANI	Immunologie, Sérologie, Hématologie.
	DANRIGAL	Pneumo-Phtysiologie.
	DESG REZ	Physique Médicale.
	DUBOIS	Obstétrique.
	DUVAL	Anatomie.
	HUET	Chimie Organique
	JAVALET	Neuro-Chirurgie.
	JEZEQUEL	Pédiatrie.
	LEBORGNE	Hydrologie.
	LENOIR	Médecine Générale et Thérapeutique

M.M.	LIMBOUR	Oto-Rhino-Laryngologie.
Mlle.	MAI VAN DAU	Anesthésiologie.
M.M.	SIMON	Electroradiologie.
	TREBAUL	Pharmacodynamie.

N.....	Bactériologie.
N.....	Botanique.
N.....	Chimie Pharmaceutique.
N.....	Chirurgie Générale.
N.....	Histologie et Embryologie.
N.....	Hygiène.
N.....	Hygiène.
N.....	Médecine Générale.
N.....	Médecine Générale et Thérapeutique.
N.....	Orthopédie et Traumatologie.
N.....	Physique Biologique.
N.....	Urologie.
N.....	Zoologie Pharmaceutique.

A Monsieur le Professeur M. CORMIER

Professeur de Matière Médicale à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Rennes.

Après m'avoir guidé pendant mon internat, vous me faites le grand honneur de me compter au nombre de vos collaborateurs depuis une dizaine d'années.

Vous avez toujours considéré mes recherches avec une grande sympathie et vos conseils me furent très précieux.

En témoignage de ma très vive reconnaissance et de mon respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur R. PARIS

Professeur de Matière Médicale à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Vous m'avez accueilli avec bienveillance dans votre laboratoire et vous m'avez guidé tout au long de mes recherches en me faisant profiter de votre très grande compétence.

En témoignage de ma respectueuse et profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur H. DES ABBAYES
Professeur de Botanique à la Faculté des Sciences
de Rennes.

Au cours de mes études universitaires, vous m'avez fait bénéficier de votre enseignement et de votre érudition.

Depuis, vous n'avez cessé de me témoigner votre constante sollicitude.

Veuillez trouver ici, avec mes remerciements, l'assurance de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur R. TIOLLAIS

Professeur de Chimie Organique à la Faculté Mixte de-Médecine et de Pharmacie de Rennes.

Vous m'avez toujours réservé un ac--- cueil très bienveillant et vous n'avez ja- mais cessé de me faire bénéficier de vos-- conseils si utiles.

A Monsieur le Professeur P. BIGET

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté Mixte -- de Médecine et de Pharmacie de Rennes.

Vous m'avez prodigué de nombreuses--- marques d'intérêt ; vos encouragements,--- votre aide et votre affabilité m'ont été-- très précieux.

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

A ma Femme

A Anne-Christine

A mes Parents

En témoignage de mon affection.

INTRODUCTION

Les pervenches indigènes et exotiques (*Vinca et Catharanthus*) ont fait l'objet, depuis une quinzaine d'années, de très nombreux travaux portant surtout sur leurs alcaloïdes.

De nombreuses bases ont été isolées, leur structure a été établie. Certaines sont maintenant très employées en thérapeutique : vincamine du *Vinca minor*, vincaleucoblastine et leirocristine du *Catharanthus roseus*.

A l'opposé des travaux chimiques et pharmacologiques très développés, les travaux de physiologie végétale sont réduits, et, en particulier, les acides aminés n'ont pas été étudiés.

Etant donné l'importance de ces acides aminés dans la biogénèse des alcaloïdes, il était intéressant d'en entreprendre l'inventaire et d'en suivre les variations au cours de la végétation et parallèlement à celles des alcaloïdes.

C'est l'étude que nous avons entreprise sur les trois espèces de Pervenches indigènes : *Vinca minor L.*, *Vinca major L.*, *et Vinca media* Hoffg. et Link.

Avant d'exposer ce travail, je tiens à adresser mes remerciements à :

- Monsieur R. PARIS, Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS, qui m'a confié ce travail et en a toujours suivi la réalisation avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance.

- Monsieur M. CORMIER, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de RENNES, qui m'a fait profiter de sa haute expérience et m'a permis de mener à bien ce travail.

- Monsieur H. NICOLLON DES ABBAYES, Professeur à la Faculté des Sciences de RENNES, qui me fit bénéficier de son profond savoir, et qui me permit de cultiver le *Vinca media* dans les jardins de son laboratoire.

- Monsieur R. TIOLLAIS, Vice-doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de RENNES, qui n'a cessé de me prodiguer conseils et encouragements.

- Monsieur P. BIGET, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de RENNES, qui m'a toujours montré des marques d'intérêt.

- Monsieur F. PELLISSIER, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de MARSEILLE, qui m'a fait parvenir des plants vivants du *Vinca media*.

- Monsieur le Professeur TROJANEK, de Prague, et Monsieur J. LE MEN, Professeur à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de REIMS, à qui je dois des échantillons d'alcaloïdes des *Vinca*.

- Monsieur P. DELAVEAU, Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS, qui me reçut avec bienveillance au début de ces recherches.

- Monsieur P. JOUAN, Professeur à la Faculté des Sciences de RENNES, qui m'initia à la Recherche Scientifique.

- Mademoiselle M. GOAS, Professeur à la Faculté des Sciences de RENNES, et Mademoiselle G. GOAS Maître de conférences à la Faculté des Sciences de RENNES, qui me firent profiter de leur expérience en physiologie végétale et qui m'accueillirent dans leur laboratoire au cours des premières années de recherches.

- Madame H. MOYSE, Assistante à la Faculté de Pharmacie de PARIS, pour l'intérêt qu'elle a apporté à ce travail.

- Monsieur Y. RONDON, de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de MARSEILLE, pour l'envoi de matériel d'étude.

Je tiens également à témoigner ma reconnaissance aux membres du laboratoire de Matière Médicale et de Botanique de la Faculté de Médecine de RENNES, pour le concours qu'ils m'ont apporté :

- Monsieur P. CILLARD.
- Madame F. BARIL.
- Madame M. GAREL.
- Madame J. LEMOIS.
- Madame M.H. SALMON-GANDONNIERE.
- Mademoiselle M. LUCAS de COUVILLE.

Le plan suivi pour exposer ce travail est le suivant :

- Matériel végétal utilisé, Récolte et conservation.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES ACIDES AMINES

CHAPITRE I : ETUDE QUALITATIVE

- Travaux antérieurs.

- Travaux personnels.

A) Choix des techniques.

1. Essais de différentes méthodes d'extraction, de purification et de séparation par chromatographie-bidimensionnelle sur couche mince et sur papier.

2. Méthode choisie.

. Extraction et purification.
. Séparation des différents acides aminés des-végétaux en trois groupes par électrophorèse préparative (BISERTE 1958).
. Séparation des acides aminés dans chaque grou pe, par électrochromatographie sur papier.

B) Applications aux Vinca.

1. Techniques utilisées et acides aminés carac térisés dans les trois espèces et leurs différents or ganes.

2. Conclusions.

CHAPITRE II : ETUDE QUANTITATIVE

- Travaux antérieurs.

- Travaux personnels.

A) Choix des techniques.

1. Extraction.

2. Dosage.

B) Résultats.

1. Choix de l'heure des prélèvements.

2. Utilisation de l'Autoanalyseur Beckman.

Dosages des différents acides aminés au cours de la végétation dans les feuilles du *Vinca minor* et du *Vinca major* pendant les années 1965 et 1966.

3. Utilisation de l'Autoanalyseur Technicon.

Dosages des différents acides aminés au cours de la végétation dans les feuilles, les fleurs et les racines du *Vinca minor*, du *Vinca major*, et du *Vinca media* pendant les années 1966 et 1967.

4. Conclusions.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES ALCALOIDES

CHAPITRE I : ETUDE QUALITATIVE.

- Travaux antérieurs.

- Travaux personnels.

A) Choix des techniques.

1. Extraction.

2. Séparation de groupes d'alcaloïdes par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.

B) Applications aux Vinca.

1. Séparation de groupes d'alcaloïdes dans les feuilles, les tiges, les racines et les fleurs du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media*.

2. Conclusions.

CHAPITRE II : ETUDE QUANTITATIVE.

- Travaux antérieurs.

- Travaux personnels.

A) Choix des techniques.

1. Extraction.

2. Dosages.

B) Résultats.

1. Dosages des alcaloïdes totaux au cours de la végétation dans les feuilles, les tiges, les racines et les fleurs du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media* pendant les années 1964, 1965, 1966 et 1967.

2. Conclusions.

TROISIEME PARTIE

Comparaison des résultats des dosages des acides aminés et des alcaloïdes totaux au cours de la végétation dans les feuilles, les fleurs et les racines du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media* pendant les années 1966 et 1967.

CONCLUSIONS GENERALES

MATERIEL VEGETAL UTILISE

- Les Pervenches indigènes sont des plantes vivaces qui produisent au printemps deux sortes de tiges : les unes couchées et s'enracinant rapidement ne présentent que des feuilles ; les autres, portant ordinairement une seule fleur, sont d'abord dressées, puis deviennent retombantes et s'enracinent ; les feuilles sont toujours vertes et opposées ; les fleurs sont bleues et s'épanouissent depuis le mois de février, jusqu'au mois de juin, parfois aussi en automne.

- Les caractères différentiels sont les suivants :

. Le *Vinca minor* L. est caractérisé par des feuilles ovales, allongées, luisantes, sans poils par le calice sans poils dont les divisions n'atteignent pas la moitié de la longueur du tube de la corolle, et par les lobes de la corolle, qui sont coupés en coin, obliquement.

. Le *Vinca major* L., (synonymes : *Vinca pubescens* Urv. ; *Vinca obliqua* Port.) est caractérisé par des feuilles ovales, beaucoup plus grandes, un peu en coeur renversé à la base et dont les bords sont poilus et ciliés, par le calice dont les divisions bordées de cils atteignent presque le haut du tube de la corolle, et par les lobes de la corolle qui sont coupés en coin, obliquement.

. Le *Vinca media* Hoffg. et Link., (synonymes : *Vinca difformis* Pourr. ; *V. acutiflora* Bert. *V. major* L. *difformis* (Pourr.) H. PICHON), est caractérisé par des feuilles ovales, plus ou moins arrondies à la base, sans poils, par le calice à divisions non ciliées, atteignant à peine la moitié de la longueur du tube de la corolle, et par les lobes de la corolle qui sont obliquement en pointe, presque en forme de losange.

- M. PICHON (1948) ne fait du *Vinca media* (= *Vinca difformis)* qu'une variété du *Vinca major* type.

Cependant, ainsi que l'ont déjà signalé en-- 1958 R. PARIS et H. MOYSE (1957 et 1958) dans leur- revue sur les Pervenches, les alcaloïdes isolés jus qu'à présent du *Vinca major* et du *Vinca media* sont- différents.

M.M. JANOT, J. LE MEN et J. GARNIER (JANOT-- 1965) et laissent prévoir également une révision de la classification des variétés *major* et *difformis*-- du *Vinca major* L.

La possibilité de l'existence d'une variété- chimique pose ici un problème intéressant de chimio taxinomie (GOSSET 1963).

Une contribution à sa résolution peut être-- apportée en étudiant, sur des extraits provenant--- d'une même récolte, les corrélations qualitatives-- et quantitatives des acides aminés etdes alcaloïdes.

RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL

- Des récoltes de feuilles et de tiges du -- *Vinca minor* L, du *Vinca major* L., et du *Vinca media* Hoffg. et Link. ont été réalisées chaque mois ou à- certains stades de végétation (ces prélèvements n'é taient effectués que sur les quinze ou vingt centi- mètres supérieurs des tiges dressées ; des récoltes de boutons floraux et de fleurs ont été réalisées - au printemps à différentes phases de l'épanouisse - ment, mais des récoltes de racines n'ont été réali- sées que pendant quelques mois, à la fin de nos tra vaux, pour ne pas détruire prématurèment nos sta -- tions.

Il faut remarquer d'autre part que la fructi fication de ces trois espèces a été extrêmement mi- nime et même parfois inexistante.

- Les prélèvements proviennent en effet tou-- jours des mêmes stations : le *Vinca minor* L. provient d'une station ombragées à Montfort-sur-Meu, et le *Vin ca major* L. d'un talus ensoleillé près du Minihic-sur Rance ; quant au *Vinca media* Hoffg. et Link., il est- originaire du jardin de botaniquede la Faculté de Mé- decine et de Pharmacie de Marseille ; Monsieur le Pro fesseur PELLISSIER et Monsieur RONDON, que nous remer cions très vivement ici, nous avaient fait parvenir - en Juin 1964 des plants vivants qui sont cultivés ac- tuellement dans un endroit abrité du jardin de bota-- nique de l'Institut Lucien DANIEL à Rennes, mis très- aimablement à notre disposition par Monsieur le Pro-- fesseur NICOLLON DES ABBAYES.

Ces trois espèces se trouvent donc depuis au-- moins quatre années, dans le Bassin de Rennes, et la- Vallée de la Rance, dans des conditions édaphiques et microclimatiques variées.

CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL

- La conservation du matériel végétal présente une importance primordiale ; *elle doit permettre l'hibernation des enzymes, et non leur destruction, de manière à doser à la fois, après réhydratation et réchauffement, quelques activités enzymatiques et quelques métabolites primaires et secondaires d'un même organe.*

- Les organes ont été séparés les uns des autres dès leur récolte, et séchés à 30°C. sur chlorure de calcium en grand excès et sous vide pendant 48 heures.

- Les organes sont ensuite pulvérisés dans un broyeur électrique, et la poudre obtenue, tamisée (module 28), versée dans des flacons en verre bouchés (liège et ruban adhésif) est conservée à une température de l'ordre de 0 à + 44°C. au réfrigérateur.

- *Ce procédé permet d'inhiber très rapidement l'action des enzymes sans les détruire ; cette inhibition non destructrice est très importante pour les études enzymologiques ultérieures et n'est pas réalisée par la stabilisation à l'éthanol bouillant.*

Ce dernier procédé détruit les protéïnes enzymatiques et extrait les acides aminés ; la dessication de l'organe n'a donc plus d'intérêt et les dosages ne peuvent être évalués en fonction d'un poids sec.

Il faut en outre, lyophiliser rapidement l'éthanol extractif qui se trouve évidemment en quantité importante.

Notre procédé de dessiccation sous vide, à -- une température peu élevée, légèrement supérieure à- celle du laboratoire, et en présence d'un grand ex-- cès de chlorure de calcium anhydre, présente de très nombreux avantages par rapport à la technique clas-- sique de stabilisation par l'éthanol bouillant, et - il est en accord avec les conclusions de la thèse de M. NGUYEN HIEP traitant des différentes techniques - de dessiccation des plantes médicinales (NGUYEN HIEP 1966).

La conservation des principes actifs est ainsi très bonne, mais pour maintenir dans une poudre - séche, à la fois les substrats et les enzymes en é-- tat d' "hibernation", il serait préférable, en dépit de la quantité et du nombre important de prélève --- ments, de conserver ces poudres en tubes scellés --- sous vide.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES ACIDES AMINES

CHAPITRE I

ETUDE QUALITATIVE

TRAVAUX ANTERIEURS

- La séparation des acides aminés des Pervenches indigènes n'a fait l'objet d'aucune étude avant celle-ci.

- JUTISZ, en 1960 (JUTISZ 1960), puis plus tard, en collaboration avec DE LA LLOSA (JUTISZ I963) a fait le point de nos connaissances antérieures à 1963, se rapportant aux techniques générales d'analyses des acides aminés.

Quelques faits nouveaux, en biochimie végétale sont apparus depuis cette date D. BOULTER réalise l'extraction des extraits végétaux par un tampon phosphate 0,01 M à pH 7, après une déprotéinisation à l'acide picrique (BOULTER 1966) ; D.R. LONDON compare différents modes de préparation des liquides biologiques en vue de la chromatographie des acides aminés (LONDON 1966) tandis que d'autres auteurs réalisent l'extraction des acides aminés par précipitation des-

protéïnes à l'aide de l'acide trichloracétique, de l'acide perchlorique, de l'acide picrique, ou encore par dialyse, par ultrafiltration comme VAN STEKELENBURG et DESPLANQUE (VAN STEKELENBURG 1966) et aussi au moyen de l'éthanol froide à 70 ou 80% (v/v) (EDREVA-KANDOVA 1964, BISERTE 1963, STEWART 1963, FUKUDA 1963, AFRIKYAN 1964, HOFSTRA 1964, MOHAN DAS 1965). L'élimination des pigments se faisant par passage sur résine échangeuse d'ions ou sur charbon activé (JUTISZ 1947).

Il faut noter quelques progrès dans la mise en évidence et le dosage des acides aminés par la ninhydrine (MOROZOVA 1965, KRISHNASWAMY 1965, YA PIN LEE - 1966), l'adjonction d'acide ascorbique rend le réactif plus stable (BARTOS 1964, SCHWERDFEGER 1965), la présence de diéthylamine rend les colorations plus spécifiques (CIRCO 1963), et il est possible, sur un chromatogramme, d'identifier plusieurs acides aminés en appliquant successivement des réactifs différents (ROSSETTI 1965). D'autre part, WITTMANN a découvert d'autres réactifs sensibles tels que la triméthylén - quinisatine - 1,8 et le mésoxalylcarbazole - 1,9 ---- (WITTMANN 1964 et 1965), et BONNAFE (1964), de même que HOCHSTRASSER (1966) signalent l'action de l'acide trinitrobenzyl sulfonique, révélée pour la première fois par SATAKE (1960).

D'autre part, la pulvérisation des révélateurs peut être avantageusement remplacée en dissolvant la ninhydrine dans le solvant de chromatographie. Cette technique augmenterait la sensibilité et la précision de la révélation (EL-KHADEM 1963, FRODYMA 1965).

En ce qui concerne la chromatographie sur papier, peu de progrès : les techniques de radiochromatographie sont évidemment très intéressantes (NOFRE 1963), ainsi que les papiers échangeurs d'ions, tels que celui à l'acide sulfonique de HARTEL, COPPER, et VAN BOCHOVE (HARTEL 1963).

L'électrophorèse sur papier a fait quelques progrès par l'apparition des hauts voltages (BRAUN 1963,- BLACKBURN 1965), mais il semble que dans le domaine du papier, ces deux techniques aient besoin l'une de l'autre, et quece soient les couplages électrophorétiques- et chromatographiques qui donnent les meilleurs résultats (BISERTE 1963). Ces chromato-électrophorèses pouvant même se faire sur couche de cellulose déposée sur papier (MARTIN KAPLAN 1962) ou sur couche épaisse (plusieurs millimètres) de cellulose (MONTANT 1960).

La chromatographie en couche mince montre des - progrès plus intéressants (ROSSETTI 1965, CODERN 1963, BRENNER 1964, BURGI 1965, ESSER 1965, DELLACHA 1965,-- PATAKI 1965, PASTOR 1965) depuis la mise au point de-- JUTISZ, et surtout depuis les revues d'ensemble de --- DEMOLE (DEMOLE 1961) et de WOLLISH (WOLLISH 1961).

La technique de chromatographie circulaire et-- la technique électrophorétique existent également en-- couche mince (NYBOM 1964, MUSHA 1965) : n'oublions pas de citer, avant d'exposer nos techniques personnelles, l'emploi possible de quantités relativement importan-- tes d'échantillons (FESSLER 1964), et l'utilisation de séries de solvants dans les chromatographies multidi-- mensionnelles (VON ARX 1963, HULTIN 1965).

TRAVAUX PERSONNELS

Ce chapitre comprend une étude comparative et une mise au point d'un ensemble de techniques analytiques destinées à nous permettre d'obtenir des extraits végétaux purifiés, et en particulier, ce qui fut un problème très difficile à résoudre, entièrement dépigmentés.

Une seconde étape consiste également à étudier comparativement certaines méthodes chromatographiques sur papier et en couche mince, et à mettre au point un ensemble de techniques chromato-électrophorétiques sur papier permettant de fractionner les extraits des différents organes des Pervenches en plusieurs groupes d'acides aminés, puis de séparer chacun des acides constituant ces groupes.

Une troisième phase permet l'étude qualitative des acides aminés des différents organes du *Vinca minor*, du *Vinca major*, et du *Vinca media* récoltés à différents stades de leur végétation.

A) CHOIX DES TECHNIQUES.

I. ESSAIS DE DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION, DE PURIFICATION ET DE SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE-- BIDIMENSIONNELLE SUR COUCHE MINCE ET SUR PAPIER.

a) Pigments :

Au cours de nos expériences en vue de l'extraction et de la séparation des acides aminés des feuilles du *Vinca minor*, nous nous sommes heurté à un problème-- préalable difficile, à savoir l'élimination des pig---- ments, chlorophylliens ou autres.

Avant d'avoir trouvé et surtout bien précisé les nombreuses opérations qui permettent d'avoir une bonne- séparation des acides aminés, il fut nécessaire de réaliser, pendant longtemps, de très nombreux essais dont- voici les principaux :

Le point de départ était une extraction hydro--- alcoolique qui éliminait déjà la majeure partie des --- chlorophylles, puis une délipidation et une élimination d'autres pigments par l'éther de pétrole.

Après cette extraction et cette délipidation, --- l'extrait était coloré en brun-rouge, et si nous le soumettions à une électrophorèse préparative à pH 3,9 nous trouvions deux pigments, l'un vert, l'autre rouge, qui- migraient avec la même vitesse que certains acides aminés à comportement acide et à comportement neutre.

Une élimination des pigments, restant après ex-- traction hydro-alcoolique, et délipidation, fut alors-- essayée par filtration sur Séphadex G-25 (PORATH 1960). L'extrait lyophilisé est repris par de l'acide chlorhydrique 0,01 N., et déposé sur la colonne de Séphadex --

(6 g. de Séphadex G-25 "fine" dans une colonne de 10 mm de diamètre). Les pigments brun-rouge se séparent en pigments rouges et verts mais ils passent tous -- très rapidement en même temps que les acides aminés. Donc, résultat négatif.

L'élimination de ces pigments fut tentée en-- suite en faisant passer l'extrait sur une colonne -- d'acide silicique dans le butanol chlorhydrique dont on augmenterait progressivement la concentration en- acide chlorhydrique 0,01 N.

Un essai fut entrepris pour adsorber les pig- ments sur le talc, mais sans résultat.

D'autre part, il est apparu, après électropho rèse et révélation par la ninhydrine que des compo-- sés réagissant à la ninhydrine étaient solubles dans l'alcool amylique tertiaire, le chloroforme et le--- benzène ; nous ne pouvions donc pas nous servir de-- ces solvants pour extraire les pigments, bien qu'une extraction chloroformique au Soxhlet ait donné de--- bons résultats en ce qui concerne la dépigmentation.

Une extraction méthanolique des acides aminés entrainait également des pigments (BASSHAM 1960).

L'adsorption des pigments sur charbon animal- fut ensuite essayée : les pigments étaient bien ad-- sorbés et l'éluat passait incolore, mais ce charbon- était impur et la quantité d'acides aminés éluée mon trait que ce charbon n'était pas valable.

C'est alors que nous avons utilisé du charbon végétal activé "Activit 50 XL" selon la méthode pro- posée par M. JUTISZ et E. LEDERER (JUTISZ 1947), qui sépare les acides aminés aliphatiques des acides ami nés aromatiques.

L'élution des acides aminés fut vérifiée par- la méthode de SÖRENSEN (Annales pharmaceutiques fran çaises 1961). Nous avons ainsi constaté que l'élu -- tion était bonne, en trouvant la même quantité d'a--

cides aminés, avant et après passage sur charbon ; -- mais cette technique n'ayant pas été retenue par la - Pharmacopée Française de 1965 (8ème édition), nous -- n'avons pas tenu compte des résultats obtenus, et --- nous avons vérifié la qualité de cette élution en --- réalisant des essais électrophorétiques. Les résul--- tats nous ont donné entière satisfaction.

Ensuite, ayant remarqué que des pigments étaient élués en même temps que les acides aromatiques, - mais dès le début de l'élution, il était nécessaire - de vérifier, par électrophorèse préparative, si ces - pigments ne passaient pas seuls dans les premiers ml. de l'élution.

Il est apparu alors que les acides passaient - également, pour la majeure partie, dès le début de -- l'élution.

Nous avons donc réalisé une étude électrophoré tique avec un extrait correspondant à 500 mg de pou - dre.

Une constatation s'imposa, à savoir que, avec- une faible quantité d'extrait, les acides aminés aromatiques pouvaient être séparés des pigments de façon satisfaisante. L'élution de la zone correspondant aux acides aminés permet d'obtenir un extrait entièrement dépigmenté.

Le passage sur charbon est toutefois nécessaire auparavant pour obtenir les acides aliphatiques puri - fiés et dépigmentés, car il a été constaté que les pig ments, séparés des acides aromatiques par électropho - rèse, ne le seraient pas des acides aliphatiques.

L'opération en deux temps est donc nécessaire :

d'abord séparation des acides aliphatiques sur- charbon, ensuite, après passage sur charbon, séparation des acides aromatiques par électrophorèse préparative.

b) Séparation des acides aminés :

L'élimination des pigments fut donc ainsi réalisée, après de très longs mois, et l'étape suivante de notre travail consista à essayer de séparer les divers acides aminés contenus dans notre matériel végétal.

Chromatographie en couche mince :

Nous voulions séparer tous les acides présents en une migration bidimensionnelle, et pour cela, nous avons comparé quelques techniques de chromatographie en couche mince.

La technique de E. MUTSCHLER et H. ROCHELMEYER (MUTSCHLER 1959) et la technique de M. BRENNER et A. NIEDERWIESER (BRENNER 1960) ne nous ont pas donné satisfaction.

Dans ces deux techniques, parmi les 14 acides aminés suivants : alanine, arginine, asparagine, glutamine, glycine, histidine, leucine, lysine, méthionine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine, seuls 5 sont séparés : leucine, méthionine, proline, tyrosine, valine ; ce qui, en réalité, est en accord avec les résultats de M. JUTISZ et P. DE LA LLOSA (JUTISZ 1963).

En fait, les techniques de chromatographie en couche mince semblent être surtout intéressantes pour vérifier la séparation de quelques acides aminés bien définis ; c'est ce que nous a permis de réaliser la méthode de R.L. MUNIER et G. SARRAZIN (MUNIER 1965), qui sépare en couche mince les acides aminés de grande mobilité, à savoir les 7 acides aminés suivants : isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine.

Notre ensemble de manipulations peut ainsi être contrôlé en ce qui concerne deux séparations délicates : celles des acides aromatiques : (phénylalanine, tryptophane, tyrosine) et celle de la leucine -

et de l'isoleucine ; ces 5 acides aminés étant très-bien séparés par la technique de R.L. MUNIER et G. - SARRAZIN qui emploie des plaques de cellulose et les 2 solvants suivants :

1ère dimension :

Alcool amylique tertiaire	: 400
Méthyléthylcétone	: 400
Eau distillée	: 200
Pyridine	: 50

2ème dimension :

Alcool butylique tertiaire	: 355
Méthanol	: 395
Eau distillée	: 200
Pyridine	: 50

Des cuves Shandon fermant hermétiquement furent employées et les migrations réalisées à la température de 20°C, pendant 1 h 30 en ce qui concerne la première dimension, et 2 heures pour la seconde dimension. (Les plaques de cellulose avaient 300μ d'épaisseur).

Il apparaît que parmi les acides aminés que R.L. MUNIER et G. SARRAZIN séparent très bien par leur technique, (fig. 1), se trouvent ceux que nous avions séparés par les trois méthodes des auteurs précédemment cités, mais les autres acides aminés ne sont séparables d'une manière valable dans aucune de ces quatre techniques de chromatographie en couche mince.

Nous devons alors dans ce but, et en dehors de la chromatographie sur colonne, utiliser les techniques d'électrophorèse et de chromatographie sur papier.

Chromatographie bidimensionnelle sur papier :

Nous avions donc, pour séparer tous les acides-aminés, essayé la chromatographie bidimensionnelle sur papier selon la technique de A. LEVY et D. CHUNG (LEVY 1953).

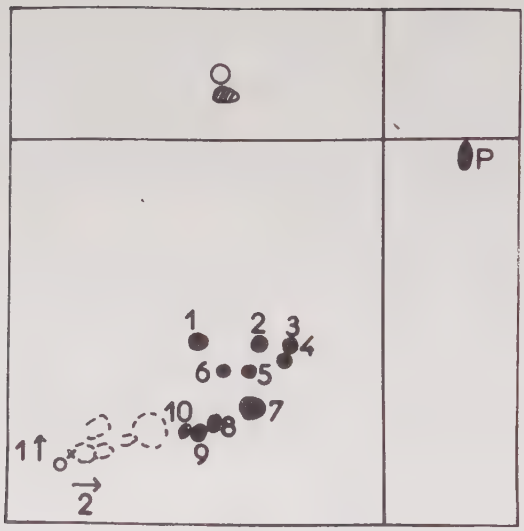


Figure 1

1 = leucine
2 = isoleucine
3 = phénylalanine
4 = valine
5 = méthionine
6 = tyrosine
7 = proline
8 = alanine
9 = tryptophane
10 = thréonine

P = pyronine
O = orangé G

En suivant cette technique, de nombreux es--- sais furent réalisés dans chaque dimension et dans - les deux dimensions, mais n'ont pas donné de résul - tats valables.

En effet, la méthionine, le tryptophane, et - la valine n'étaient pas séparés après les deux migra tions chromatographiques, et de plus, les acides ami nés basiques, ainsi que la cystine, avaient des Rf - beaucoup trop faibles et n'étaient pas séparés entre eux.

Aussi avons-nous abandonné cette technique -- qui présentait également des taches trop diffuses et allongées.

Et c'est alors que furent entreprises des ex- périences par chromato-électrophorèse après dépigmen tation des extraits sur charbon végétal activé.

Le couplage de méthodes employé, inspiré des - techniques de G. BISERTE, P. BOULANGER et P. PAYSANT (BISERTE 1958), présente un pouvoir de résolution -- beaucoup plus poussé que celui de la seule électro-- phorèse ou de la seule chromatographie. Il nous a -- donné entière satisfaction.

Mais évidemment, la meilleure technique ac -- tuelle semble être encore la chromatographie sur ré- sines selon les méthodes de S. MOORE, D.H. SPACKMAN- et W.H. STEIN (MOORE 1958) et de K.A. PIEZ et M. MOR RIS (PIEZ 1960) que nous utilisons pour l'étude quan titative au moyen d'autoanalyseurs d'acides aminés.

c) Essais des réactifs utilisés pour révéler les électrophorèses et les chromatographies :

Nous avons essayé le réactif à l'isatine et à l'acétate de zinc, le réactif à la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) en milieu butanol acétique, et le réactif de Moffat et Lytle (MOFFAT 1959).

En ce qui concerne le réactif de MOFFAT et LYTLE, la sensibilité est de 5 µg. pour l'asparagine, la phénylalanine, et la proline ; pour les autres acides aminés, cette sensibilité est de 1 µg.

Ce réactif, nettement moins sensible que la ninhydrine seule, permet par contre, par les couleurs différentes qu'il donne selon les acides aminés, de différencier ces acides entre eux quand ils sont en quantité convenable.

C'est ce que nous avons pu faire en nous basant sur les couleurs et sur les Rf dans les deux dimensions.

Avec 10 µg, nous avons obtenu des colorations bien visibles et assez diverses (bleu, jaune, brun, violet), avec des intensités et des tons différents.

En ce qui concerne la ninhydrine, sa sensibilité est nettement plus forte que celle du réactif de MOFFAT et LYTLE, et avec 10 µg d'acides aminés les taches sont alors trop grosses et étendues, mais ce réactif permet de voir des taches d'acides qui, même avec 10 µg, sont à peine perceptibles avec le réactif de MOFFAT et LYTLE.

En ce qui concerne l'isatine, la proline était bien colorée en bleu mais les autres acides avaient presque disparu par le lavage.

En résumé, l'utilisation du réactif à la ninhydrine et au nitrate de cuivre de MOFFAT et LYTLE est d'un emploi plus facile et plus reproductible (pas de lavage) que celui du réactif à l'isatine.

De plus, il donne de meilleures différences de colorations selon les acides aminés, et il servira donc pour différencier les divers acides aminés.

Par contre, pour chercher de très petites quantités d'acides aminés, il faudra toujours utiliser le réactif à la ninhydrine seule, bien qu'il ne soit pas très spécifique.

De plus,nous fixons, dans le cas de la révélation à la ninhydrine, les colorations par le chlorure de cadmium en milieu hydro-méthanolique.

d) Essais pour la séparation chromato-électrophorétique des acides aminés à comportement neutre :

Electrophorèse :

Nous avons essayé les papiers suivants :

Whatman 3 MM, Whatman 2, Arches 302, Arches 304, mais c'est le papier Whatman n° 3 qui a donné les meilleures taches.

Des essais de durée furent également réalisés:

En 8 heures les acides étaient médiocrement séparés.

En 18 heures l'alanine et la glycine sortaient de la feuille.

Et c'est en 16 heures que la meilleure séparation et la meilleure migration furent obtenues en vue de la seconde dimension.

En réalisant ces essais, il est apparu que la seule migration électrophorétique permet déjà un certain fractionnement des acides aminés mais elle n'est pas suffisante, et il faut la coupler, en seconde dimension, avec une chromatographie.

Chromatographie :

Sur papier Whatman n° 3 et à 30°C ± 1°C. nous avons réalisé des essais solvants ; la meilleure migration et la meilleure séparation furent obtenues avec le solvant (BARDET 1958) : butanol, méthanol, acide acétique, eau distillée (125 : 50 : 50 : 100). La migration, surtout, était moins bonne avec le solvant précédemment utilisé : butanol, acide acétique, eau distillée (4 : 1 : 5).

En ce qui concerne la durée de migration, il est apparu que le temps de 12 heures était un maximum et que nous obtenions la meilleure séparation avec une migration de 10 heures.

En tenant compte de ces essais, nous avons alors réalisé des cartes d'acides aminés témoins en électrophorèse, en chromatographie, et en électrochromatographie.

2. METHODE CHOISIE

Extraction et purification :

Extraction :

L'extraction est réalisée à froid, sur 150 mg de poudre, par de l'éthanol à 80% (V/V) (EDREVA-KANDOVA 1964, BISERTE 1963, STEWART 1963, FUKUDA 1963, AFRIKYAN 1964, HOFSTRA 1964, MOHAN DAS 1965, MADAN - 1967).

Il est apparu en effet que le traitement à chaud, au soxhlet, entrainait des petits peptides qui sont déjà décelables à froid.

Nous avons alors adopté un mode d'extraction par agitation magnétique dans une fiole conique.

L'extraction est totale après le cinquième lavage. La vérification a été faite en soumettant le liquide du sixième lavage à une électrophorèse préparative ; la révélation à la ninhydrine n'a pas permis de déceler des traces d'acides aminés.

La technique exacte est la suivante :

On réalise d'abord une extraction de 20 minutes, à l'agitateur magnétique, dans une fiole conique de 250 ml avec 50 ml d'éthanol à 80% (v/v).

On centrifuge (il s'agit donc d'une technique par marc pressé), et on lave trois fois 10 minutes à l'agitateur magnétique avec 25 ml de solvant à chaque lavage.

Deux lavages sont ensuite réalisés de la même manière, mais le solvant est amené à pH voisin de 2,5 par HCl N. (Ajouter 25 ml HCl N à chaque lavage).

On centrifuge après chaque lavage et on évapore le liquide d'extraction à l'évaporateur rotatif, à une température de 40°C. (MADAN 1967).

Dégraissage et élimination des pigments chlorophylliens :

Le dégraissage et l'élimination partielle de ces pigments sont obtenus par l'éther de pétrole.

On reprend l'extrait sec par 15 ml d'acide acétique à 5%, en trois fois.

On extrait dans une ampoule à décanter avec de l'éther de pétrole par fractions de 30 ml jusqu'à ce que ce solvant reste incolore.

La solution d'acides aminés n'a plus de pigments verts mais il reste des pigments brun-rouge, dont nous n'avons pas entrepris l'étude.

Une vérification s'imposait :

Nous avons évaporé les diverses fractions d'éther de pétrole et nous avons soumis l'extrait à une étude électrophorétique.

La révélation à la ninhydrine a montré qu'il n'y avait pas eu entrainement d'acides aminés.

Elimination des pigments brun-rouge et séparation des acides aminés aliphatiques et des acides aminés aromatiques.

Cette élimination et cette séparation sont réalisées par adsorption sur charbon végétal activé "Activit 50 XL", selon la méthode de M. JUTISZ et E. LEDERER (JUTISZ 1947).

Cette méthode consiste en ceci :

"Les substances colorées de nature aromatique sont toujours fixées sur charbon actif quand on traite la solution étudiée par cet adsorbant.

Les acides aminés et les peptides aromatiques sont cependant adsorbés en même temps, et pour les éluer, il faut laver le charbon par l'eau saturée d'acétate d'éthyle".

Préparation de l'adsorbant :

On fait bouillir 0,50 g d'Activit 50 XL pendant 5 minutes avec 4 ml d'acide acétique à 20% en vue de sa purification.

On centrifuge, puis on lave le charbon avec 15 ml d'eau chaude, on le traite ensuite par 10 ml d'eau contenant 2 mg d'éphédrine.

(Le traitement à l'éphédrine a pour but de "désactiver" partiellement le charbon : faute d'une telle désactivation, l'élution des acides aminés aromatiques n'est pas complète).

On agite pendant 10 minutes, puis on verse la suspension dans une colonne de 10 mm de diamètre.

La colonne est lavée successivement avec 15ml d'eau, puis avec 35 ml d'acide acétique à 5%.

Nous avons vérifié ce lavage en évaporant ces 35 ml après leur passage sur la colonne et en les soumettant à une électrophorèse préparative. La révéla -- tion par la ninhydrine a montré que ce lavage était -- correct.

Chromatographie sur colonne :

Nous prélevons et nous versons sur la colonne exactement 10 ml de la solution acétique (acide acétique à 5%) d'acides aminés, dégraissée et partiellement dépigmentée précédemment.

Cette quantité correspond donc à 100 mg de -- poudre. Par électrophorèse préparative et révélation à la ninhydrine, il est apparu évident que les acides aminés aliphatiques commençaient à passer avec ces premiers ml. d'acide acétique ; il faut donc recueillir - aussitôt cet acide dans un ballon, puis éluer, ou plutôt laver la colonne avec 30 ml d'acide acétique à 5%. Les substances non aromatiques passent dans le filtrat et les acides aminés aliphatiques sont ainsi en solu-- tion incolore.

Nous avons vérifié ce lavage en faisant pas-- ser à nouveau 30 ml d'acide acétique à 5% sur la colon ne, et après évaporation et électrophorèse préparative la révélation à la ninhydrine a montré que l'élution - des acides aminés aliphatiques était totale.

L'élution de la fraction aromatique se fait, dans le cas de la phénylalanine et de la tyrosine, par 125 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle.

Toutefois, le tryptophane libre nécessite pour son élution 225 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle.

L'élution des acides aminés aromatiques est alors réalisée avec 250 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle que l'on recueille dans un 2ème ballon.

Nous avons vérifié cette élution en faisant passer à nouveau sur la colonne 200 ml de ce solvant et après évaporation et électrophorèse préparative, la révélation à la ninhydrine a montré que l'élution des acides aminés aromatiques était totale.

Ces acides aminés aromatiques sont évidemment souillés par les pigments brun-rouge ; on évapore séparèment les deux éluats presque à sec. On transvase le résidu minimum dans deux tubes à essai en lavant les ballons. On évapore à sec les deux tubes à essai.

Séparation des différents acides aminés des végétaux en trois groupes par électrophorèse préparative : (BISERTE 1958).

En nous inspirant des travaux de BISERTE, BOULANGER et PAYSANT d'une part (BOULANGER 1951, BISERTE 1958 et 1960) et de MONTANT d'autre part (MONTANT 1956 et 1957) nous avons mis au point les techniques suivantes de séparation qualitative des acides aminés.

Stabilisateur de courant :

L'appareil utilisé est stabilisé en ce qui concerne l'intensité. La quantité de courant traversant les bandes de papier est, alors constante même au cours d'électrophorèse de 18 à 20 heures et en dépit des variations de résistance du circuit d'utilisation. Il en résulte une très grande régularité dans les séparations électrophorétiques et une reproductibilité constante des

documents ; la vitesse de migration d'une particule n'étant constante que si l'intensité et la valeur du pH restent stables pendant l'expérience. Le stabilisateur de courant continu que nous avons utilisé permet d'obtenir des tensions variables de 0 à 1000 volts et des intensités de 0 à 50 milliampères. Un voltmètre et un milliampèremètre branchés dans le circuit assurent le contrôle des valeurs désirées et de la stabilité de l'intensité du courant.

Cuves à électrophorèse (JOUAN 1965)

Nous avons réalisé un système de cuves indépendant de l'appareillage électrique. Nous inspirant des travaux de DURRUM (BLOCK 1956) et de JOUAN (JOUAN 1956), nous avons adopté la technique de l'enceinte close avec évaporation contrôlée du solvant. Dans cette méthode, le papier à électrophorèse est disposé verticalement, en V renversé, entre les deux bacs à tampon et repose en son milieu sur l'arête d'une lame de plexiglass. Ses deux extrémités plongent dans les cuves. Il est recouvert d'une cloche munie à sa partie supérieure d'un dispositif absorbant (amiante ou papier filtre), permettant de réduire l'évaporation et de réaliser une enceinte parfaitement close assurant à l'intérieur une humidité constante.

Nos cuves ont été entièrement construites en plexiglass (constructeur S.A.R.I.C., 8 passage Bonnameu, NANTES), et leurs dimensions calculées dans le but d'utiliser, avec un encombrement minimum, des papiers de différentes dimensions, et surtout dans le but d'utiliser des feuilles entières de papier Whatman. La longueur totale est de 54 cm, la largeur 43 cm, et la hauteur des bacs de 7 cm. Chaque cuve, d'une capacité d'environ 2000 ml, est subdivisée en deux loges d'inégale capacité, communicant entre elles par une fente étroite de 40 cm de long et 5 mm de large. La plus petite sert de logement aux électrodes, et l'extrémité du papier plonge dans l'autre. Les électrodes sont ainsi aussi éloignées que possible du papier pour éviter-

les courants de convection susceptibles de gêner la migration des corps électriquement chargés ; toute variation de pH au niveau du papier étant empêchée. Les deux cuves sont unies extérieurement par un tuyau de caoutchouc et un robinet à trois branches, permettant d'obtenir l'égalité des niveaux du tampon dans les deux bacs, ou leur vidange simultanée. (fig. 2).

Nous utilisons des électrodes en platine de 20 cm de longueur, logées dans un cadre amovible.

Le support-papier vertical est lui-même mobile et muni d'un système réglable à crémaillère donnant la possibilité de régler sa hauteur à volonté, suivant la longueur du papier utilisé. Nous avons pu ainsi opérer sur des feuilles de papier Whatman entières de 57 cm de longueur et 46,5 cm de largeur. Les dimensions de nos cuves et les perfectionnements apportés nous ont permis de réaliser des électrophorèses bidimensionnelles et d'associer l'électrophorèse à la chromatographie ; combinaison qui nous ont été fort utiles pour nos recherches.

Le couvercle des cuves est du type conique et recouvert à l'intérieur de papier filtre très épais, qui assure l'absorption des gouttelettes d'eau évaporée au niveau du papier à électrophorèse par l'effet JOULE et qui se condensent sur les parois de l'appareil.

Bien que ses dimensions aient été volontairement restreintes, ce modèle de cuves permet d'utiliser des papiers de grandes dimensions ; grâce à son support-papier réglable en hauteur, l'emploi de papiers plus ou moins grands est possible. L'amovibilité de ce support offre l'avantage de la pratique de l'électrophorèse sur papier disposé horizontalement. Elle permet également de disposer dans la cuve des plaques de gélose ou d'amidon pour l'électrophorèse sur les supports inertes.

Les électrodes sont indépendantes de la cuve leur nettoyage, après électrophorèse, se trouve ainsi facilité. C'est, en outre, dans le but de faciliter les manipulations que les cuves sont munies d'un robinet de vidange des bacs à solution tampon.

La partie centrale de la cuve à électrophorèse est suffisamment vaste pour recevoir, le cas échéant, des bacs de dimensions restreintes, utilisables pour des essais rapides de nouvelles techniques.

Ces cuves peuvent ainsi s'adapter aux besoins de l'expérimentateur (JOUAN 1965).

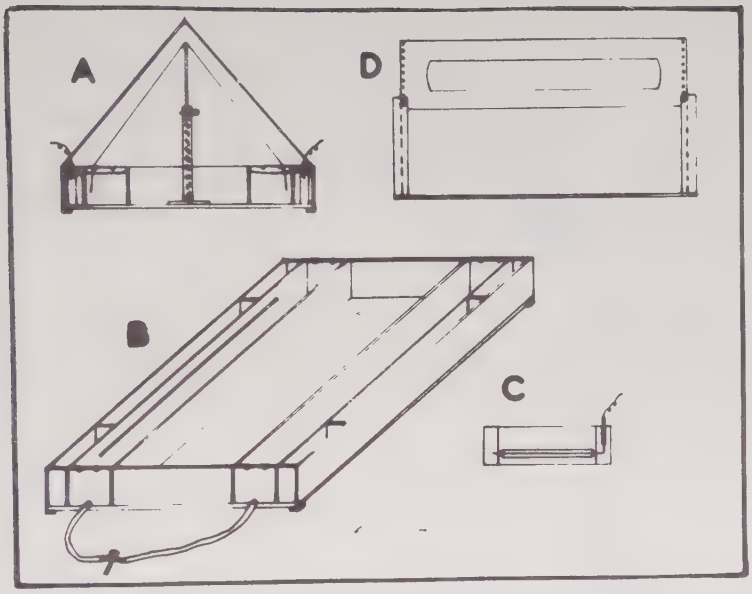


Figure 2

Dispositif d'électrophorèse sur papier utilisé pour nos recherches

A) Coupe schématique des cuves à électrophorèse
B) Bacs à solution tampon
C) Porte électrode
D) Support papier à hauteur réglable.

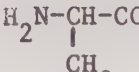
Solution des substances de références utilisées.

Les acides aminés suivants ont été utilisés :

- Acide α amino adipique.
- Acide β amino isobutyrique.
- Acide γ amino butyrique.
- Acide aspartique.
- Acide glutamique.
- Alanine.
- β alanine.
- Arginine.
- Asparagine.
- Cystine.
- Glutamine.
- Glycine.
- Histidine.
- Isoleucine.
- Leucine.
- Lysine.
- Méthionine.
- Phénylalanine.
- Proline.
- Sérine.
- Thréonine.
- Tryptophane.
- Tyrosine.
- Valine, à raison de 5 mg d'acide témoin-- dans 5 ml HCl N d'où 1 µl correspond à 1 µg.

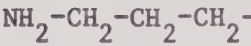
FORMULES DES ACIDES AMINES

Ac. α -aminoacétique
(glycine)

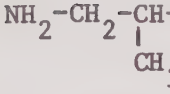


Ac. α -aminopropionique
(alanine)

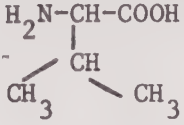
(β alanine)



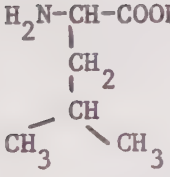
Ac. γ aminobutyrique



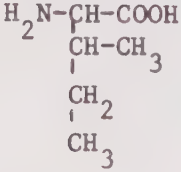
Ac. β amino isobutyrique



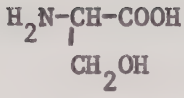
Ac. α-amino isovalérique
(Valine)



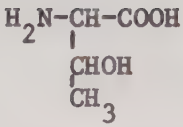
Ac. α -amino isocaproïque
(Leucine)



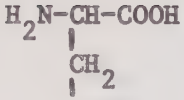
Ac. α-amino-β-méthylvalérique.
(Isoleucine)



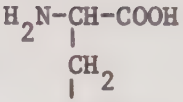
Ac. α-amino-β-hydroxy-propionique
(Sérine)



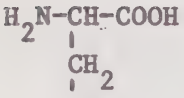
Ac. α-amino-β-hydroxy-butyrique
(Thréonine)



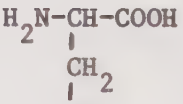
Ac. α-aminosuccinique
(Ac. aspartique)



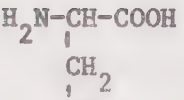
Ac. α-aminosuccinamique
(Asparagine)



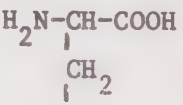
Ac. α-aminoglutarique
(Ac. glutamique)



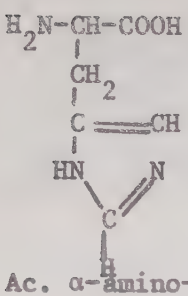
Ac. 5 amido glutamique
(Glutamine)



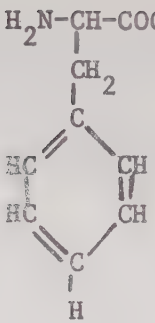
Ac. α-ε-diaminocaproïque
(Lysine)



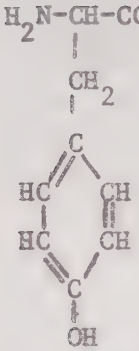
Ac. α-amino-δ-guanidino valérique
(Arginine)



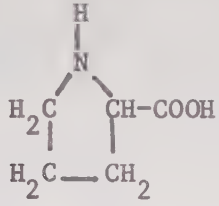
Ac. α-amino-β-5-imidazolyl propionique
(Histidine)



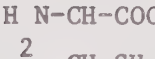
Ac. α-amino-β-phénylpropionique
(phénylalanine)



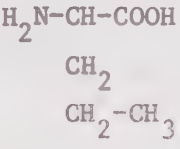
Ac. α-amino-β- (p-hydroxyphényl) propionique
(Tyrosine)



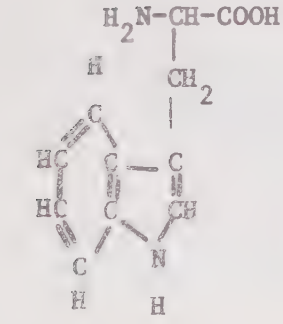
Ac. pyrrolidine-2-carboxylique
(Proline)



Ac. α-amino-β-thiopropionique
(Cystéine)



Ac. α-amino-γ-méthylthiolbutyrique
(Méthionine)



Ac. α-amino-β-3-indole propionique
(Tryptophane)

Mode opératoire de l'électrophorèse préparative :

Reprendre chaque tube contenant l'extrait sec (correspondant à 100 mg de poudre) par 0,1 ml d'acide acétique à 5%.

Déposer cet extrait à 10 cm de l'anode sur une longueur de 20 cm.

Faire un lavage du tube avec 0,1 ml d'acide et déposer ce lavage de la même manière. Après migration, selon les conditions ci-dessous, découper une bande témoin de 2 cm de large et révéler cette bande. (On peut faire la planimétrie point par point, sur papier millimétré, des taches obtenues).

- Tampon pH 3,9 : pyridine ..... 30 ml
  acide acétique ..... 100 ml
  eau distillée ..... 4870 ml
- Papier Whatman n° 3 MM (50 x 30 cm).
- Voltage : 400 volts.
- Intensité : 27 mA.
- Durée de migration : 4 heures.
- Révélation : Ninhydrine.
- Fixation : chlorure de cadmium.

Ce processus électrophorétique fait apparaître un fractionnement préalable en plusieurs groupes d'acides aminés, fractionnement du type visible sur la figure 3, à savoir :

1 groupe d'acides aminés à comportement acide (acide aspartique, acide glutamique, acide αamino adipique).

1 groupe d'acides aminés à comportement neutre (la majorité des acides).

1 groupe constitué par la βalanine et par -- l'acide βamino isobutyrique (ou "T-Spot").

1 tache constituée uniquement par l'acide γ amino butyrique.

1 groupe d'acides aminés à comportement basique (arginine, lysine, histidine).

Ce fractionnement de base étant fait, il reste à séparer chaque acide aminé, après élut[illegible] de -- chaque groupe. L'élution est réalisée au moyen de -- l'acide acétique à 5%, sous cloche hermétiquement -- close, pendant 24 heures. La migration du solvant se fait par capillarité entre deux lames de microscope-maintenues serrées par une pince. Ces lames sontdisposées sur le bord d'une boîte de Pétri surélevée -- dans laquelle se trouve le solvant, et les languettes de papier, maintenues par ces lames, sont suspendues au-dessus de cristallisoirs où se déverse l'éluat.

En fait, la figure 3 réalisée à partir d'une électrophorèse de corps témoins, montre que l'acide-γamino butyrique est déjà séparé par cette électro-- phorèse ; d'autre part, la βalanine et l'acide βamino isobutyrique pouvant être identifiés, comme nous le-verrons, soit avec la technique des acides aminés à-comportement acide, soit avec la technique des aci-- des aminés à comportement basique, il ne reste plus-que 3 groupes à séparer :

les acides aminés à comportement acide.

les acides aminés à comportement neutre.

les acides aminés à comportement basique.

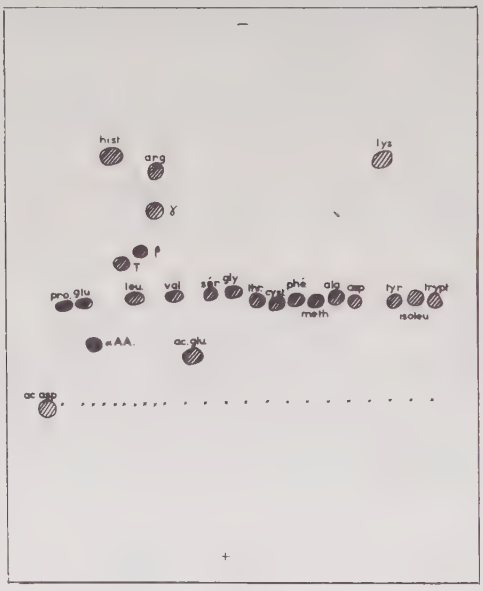


Figure 3

hist.	=	histidine	thr.	=	thréonine
lys.	=	lysine	phé.	=	phénylalanine
arg.	=	arginine	tyr.	=	tyrosine
γ	=	acide γamino butyrique	trypt.	=	tryptophane
β	=	βalanine	méth.	=	méthionine
T.	=	acide βamino isobutyrique ("T-Spot")	asp.	=	asparagine
			glu.	=	glutamine
gly.	=	glycine	cyst.	=	cystine
sér.	=	sérine	pro.	=	proline
isoleu.	=	isoleucine	αAA.	=	acide αamino adipique
ala.	=	alanine	ac. glu.	=	acide glutamique
val.	=	valine	ac. asp.	=	acide aspartique
leu.	=	leucine			

Séparation des acides aminés, dans chaque groupe, par électrochromatographie sur papier.

Séparation des acides aminés à comportement neutre, aliphatiques et aromatiques :

Cette séparation peut être réalisée d'une-- manière très nette en couplant une électrophorèse et- une chromatographie.

En première dimension, nous réalisons une électrophorèse dans les conditions suivantes :

- tampon pH 2,4 : acide acétique N.
- papier Whatmán n° 3 (57 x 46,5 cm).
- voltage : 400 volts.
- intensité : 9 mA.
- durée de migration : 16 heures.

(cf. Fig. 4).

Le dépôt des acides aminés témoins (24 acides aminés témoins, à raison de 5 µg par acide aminé) ou de l'extrait se fait en un point situé à 8 cm des-bords de la feuille. (8 cm du bord anodique pour la-- première dimension et 8 cm du côté adjacent pour la-- seconde dimension).

Pour déposer l'extrait, le tube correspon-- dant est repris par deux fois 0,1 ml d'acide acétique à 5%, si bien que nous déposons en un point une quantité d'acides aminés "neutres" correspondant à 90 mg- de poudre.

En 2ème dimension, une chromatographie est- réalisée dans le solvant préconisé par Mlle J. BARDET (BARDET 1958).

Figure 4

gly.	= glycine	ac. asp.	= acide aspartique
ala.	= alanine	αAA.	= acide αamino adipique
isoleu.	= isoleucine	glu.	= glutamine
val.	= valine	phé.	= phénylalanine
leu.	= leucine	tyr.	= tyrosine
sér.	= sérine	pro.	= proline
thr.	= thréonine	trypt.	= tryptophane
méth.	= méthionine	cyst.	= cystine
asp.	= asparagine	ac. glu.	= acide glutamique

- Solvant : Butanol, Méthanol, acide acétique, eau distillée (125 : 50 : 50 : 100).
- Papier Whatman n° 3 (46,5 x 50 cm).
- Température 30°C ± 1°C. (Cf. Fig. 5)
- Durée de migration : 10 heures.

Les acides aminés à comportement neutre sont ainsi très bien séparés et nous obtenons en 2ème dimension les Rf suivants :

Cystine	:	0,26
Asparagine	:	0,36
Glutamine	:	0,43
Sérine	:	0,44
Glycine	:	0,44
Thréonine	:	0,51
Alanine	:	0,54
Proline	:	0,55
Tyrosine	:	0,60
Méthionine	:	0,66
Tryptophane	:	0,67
Valine	:	0,68
Phénylalanine	:	0,71
Leucine et Isoleucine	:	0,75

Glutamine, sérine et glycine sont très bien séparés en 1ère dimension, de même que thréonine, proline et alanine, tryptophane, méthionine et valine, de même enfin que phénylalanine et leucine + isoleucine, comme le montre la figure 6 qui représente le chromatogramme des 15 acides aminés témoins à comportement neutre.

Figure 5

isoleu.	=	isoleucine	αAA.	=	acide α amino adipique
leu.	=	leucine	thr.	=	thréonine
phé.	=	phénylalanine	ac. glu.	=	acide glutamique
val.	=	valine	gly.	=	glycine
T.	=	acide β amino isobutyrique	sér.	=	sérine
γ	=	acide γ amino butyrique	ac. asp.	=	acide aspartique
méth.	=	méthionine	glu.	=	glutamine
trypt.	=	tryptophane	asp.	=	asparagine
tyr.	=	tyrosine	arg.	=	arginine
β	=	β alanine	hist.	=	histidine
pro.	=	proline	lys.	=	lysine
ala.	=	alanine	cyst.	=	cystine

Cet ensemble chromato-électrophorétique sépare donc très bien les 15 acides aminés à comportement neutre, mais, ayant voulu voir ce que devenaient les autres acides témoins, nous avons réduit la durée de migration électrophorétique à 8 heures.

La figure 7 montre la forte migration de ces autres acides, et la figure 8, indique la place de ces 24 acides aminés témoins après la seconde dimension (chromatographie de 10 h., Cf. Fig. 5).

Il est évident que si la séparation des 24 acides aminés peut être réalisée en une seule électrochromatographie, la séparation des "neutres" est alors devenue très médiocre, aussi conservons-nous une durée de 16 h. pour la première dimension.

Séparation des acides aminés à comportement-acide :

Pour cette séparation, comme pour les précédentes et les suivantes, nous utilisons surtout les techniques mises au point par G. BISERTE, P. BOULANGER et P. PAYSANT (BISERTE 1958) et par J. BARDET (BARDET 1958).

Une électrophorèse à pH 3,9 est d'abord réalisée avec le même tampon que pour l'électrophorèse préparative, mais selon les conditions suivantes :

- tampon : pyridine, acide acétique, eau distillée (30 : 100 : 4870) (pH 3,9)
- papier Whatman n° 1 (57 x 46,5 cm)
- voltage : 600 volts.
- intensité : 24 mA.
- durée de migration : 8 heures.

- dépôt en un point situé à 18 cm du côté anodique et à 8 cm du côté adjacent.
- quantité de chaque acide aminé : 5 µl = 5 µg.
- révélateur : ninhydrine.
- fixateur : chlorure de cadmium.

En utilisant une feuille entière et en déposant tous les acides aminés, il apparaît que les "neutres" migrent tous ensemble et sont bien séparés des "acides".

D'autre part, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont très bien séparés, mais ce dernier reste au contact de l'acide αamino adipique (fig. 3). Une chromatographie selon les conditions utilisées précédemment, permet en seconde dimension de séparer l'acide αamino adipique de l'acide glutamique (Fig.5)

Si nous ajoutons à ce groupe "acide", les groupes constitués par l'acide αamino butyrique, la β alanine, et l'acide βamino isobutyrique, ces deux derniers acides sont séparés du premier par l'électrophorèse, et la chromatographie permet de séparer la βalanine de l'acide βamino isobutyrique. (Fig. 9).

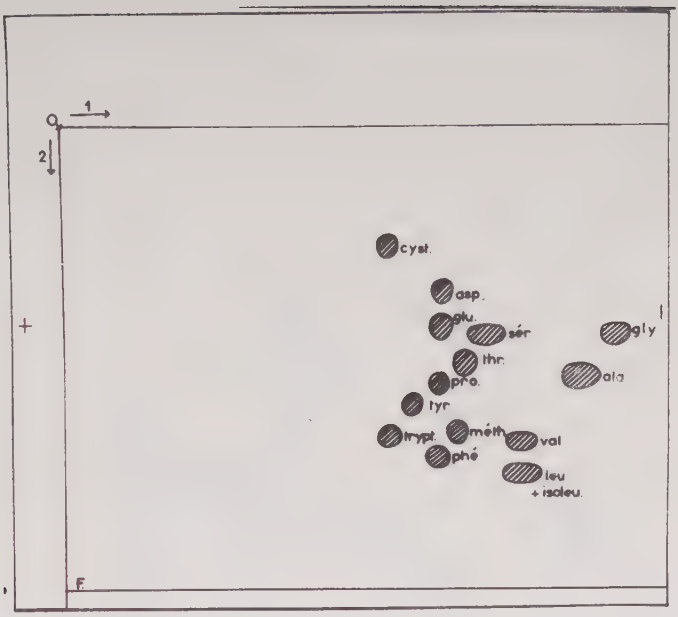


Figure 6

isoleu.	= isoleucine	ala.	= alanine
leu.	= leucine	thr.	= thréonine
phé.	= phénylalanine	sér.	= sérine
trypt.	= tryptophane	gly.	= glycine
val.	= valine	glu.	= glutamine
méth.	= méthionine	asp.	= asparagine
tyr.	= tyrosine	cyst.	= cystine
pro.	= proline		

Figure 7

β	= β alanine	asp.	= asparagine
γ	= acide γamino butyrique	glu.	= glutamine
lys.	= lysine	αAA.	= acide αamino adipique
T.	= acide βamino isobutyrique	ac. glu.	= acide glutamique
hist.	= histidine	phé.	= phénylalanine
arg.	= arginine	tyr.	= tyrosine
gly.	= glycine	pro.	= proline
ala.	= alanine	cyst.	= cystine
isoleu.	= isoleucine	ac. asp.	= acide aspartique
leu.	= leucine	trypt.	= tryptophane
val.	= valine		
sér.	= sérine		
thr.	= thréonine		
méth.	= méthionine		

Figure 8

isoleu. = isoleucine
leu. = leucine
phé. = phénylalanine
val. = valine
méth. = méthionine
T. = acide βamino isobutyrique
γ = acide γamino butyrique
trypt. = tryptophane
tyr. = tyrosine
pro. = proline
β = β alanine
ala. = alanine

αAA. = acide αamino adipique
thr. = thréonine
ac. glu. = acide glutamique
gly. = glycine
sér. = sérine
glu. = glutamine
ac. asp. = acide aspartique
arg. = arginine
lys. = lysine
hist. = histidine
asp. = asparagine
cyst. = cystine

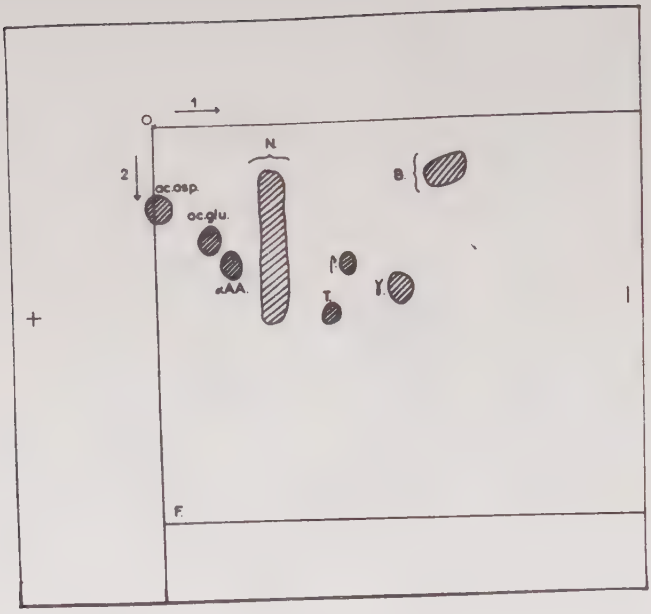


Figure 9

T. = acide βamino isobutyrique
γ. = acide γamino butyrique
N. = Neutres
β. = βalanine
αAA. = acide αamino adipique
ac. glu. = acide glutamique
ac. asp. = acide aspartique
B. = Basiques

Figure 10

ac. asp.	= acide aspartique	val.	= valine
ac. glu.	= acide glutamique	T.	= acide βamino isobutyrique
αAA.	= acide αamino adipique	phé.	= phénylalanine
cyst.	= cystine	isoleu.	= isoleucine
gly.	= glycine	β	= βalanine
sér.	= sérine	hist.	= histidine
thr.	= thréonine	leu.	= leucine
tyr.	= tyrosine	trypt.	= tryptophane
asp.	= asparagine	pro.	= proline
ala.	= alanine	γ	= acide γamino butyrique
méth.	= méthionine	lys.	= lysine
glu.	= glutamine	arg.	= arginine

Séparation des acides aminés à comportement basique :

Pour obtenir une séparation parfaite de l'arginine, de la lysine, et de l'histidine, il est obligatoire de réaliser une électrophorèse bidimensionnelle dans deux tampons différents :

En première dimension, nous utilisons les conditions appliquées à la séparation des acides aminés "acides", le groupe des trois acides aminés "basiques" est ainsi très bien séparé du groupe des acides aminés "neutres", comme nous pouvons le voir sur la figure 3, et il est également séparé de l'acide γamino butyrique, de la βalanine, etde l'acide βamino isobutyrique, (Cf. fig. 3).

lère dimension :

Tampon pH 3,9

papier Whatman n° 1 (57 x 46,5 cm).

intensité : 24 mA.
voltage : 600 volts.

durée de migration : 8 h.

dépôt en un point situé à 18 cm de l'anode.

Cf. Fig. 3

2ème dimension :

tampon pH 11,7 (ammoniaque N.).

papier Whatman n° 1 (46,5 x 46 cm).

voltage : 400 volts.

intensité : 22 mA.

durée de migration : 16 h.

dépôt à 11 cm de la cathode.

Cf. Fig. 10

Cette seconde dimension sépare très bien - chacun de ces trois acides aminés : arginine, lysine histidine, comme le montre l'électrophorégramme de - la figure II, où nous avions déposés, après la pre - mière migration, trois autres points de ces acides - qui ont servi de témoins, uniquement pour cette deuxième dimension.

Nous voyons ainsi, sur la figure II, la -- place de ces acides aminés "basiques" après les deux migrations électrophorétiques.

De plus l'addition de certains autres acides aminés permet de vérifier la séparation de l'a - cide αamino adipique de l'acide glutamique, la séparation de l'acide γaminobutyrique, et la séparation- de l'acide βaminoisobutyrique de la βalanine. (Fig. 12).

B) APPLICATIONS AUX VINCA

I. TECHNIQUES UTILISEES ET ACIDES AMINES CARACTERISES DANS LES TROIS ESPECES ET LEURS DIFFERENTS ORGANES.

Nous avons réalisé des chromato-électrophorèses sur des extraits provenant des trois Perven -- ches, obtenus et conservés selon la méthode décrite- page 27.

Les photographies suivantes proviennent -- d'un extrait de feuilles du *Vinca major*.

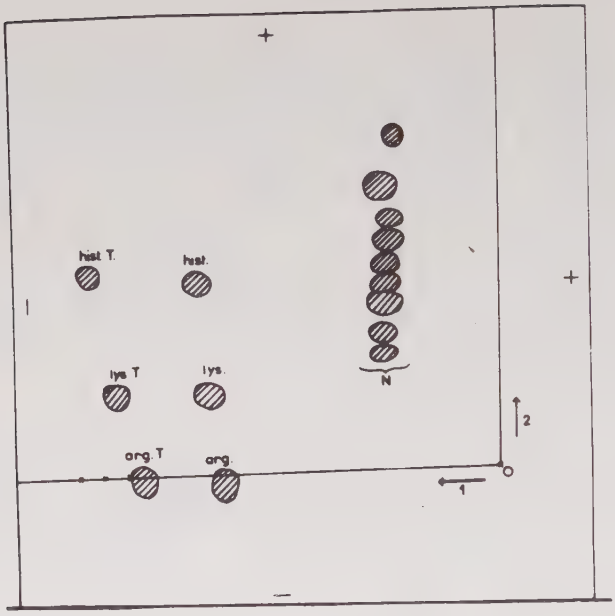


Figure 11

hist. = histidine
lys. = lysine
arg. = arginine
N. = Neutres

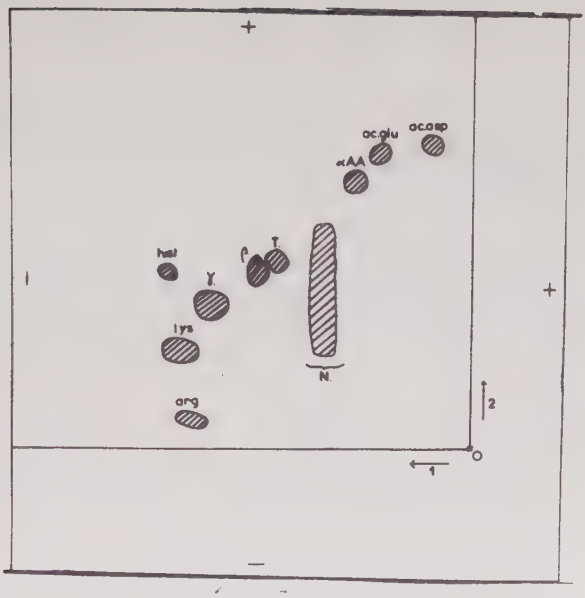


Figure 12

ac. asp. = acide aspartique
ac. glu. = acide glutamique
αAA. = acide αamino adipique
N. = Neutres
T. = acide βamino isobutyrique
β = βalanine
hist. = histidine
γ = acide γamino butyrique
lys. = lysine
arg. = arginine

Electrophorèse préparative des acides aminés aliphatiques :

Après extraction hydro-alcoolique, dégraissage et dépigmentation à l'éther de pétrole, puis filtration sur charbon activé, nous reprenons un des tubes précédemment préparés (extrait correspondant à 100 mg de poudre de feuilles) par 0,1 ml d'acide acétique à 5%.

Le dépôt se fait à 10 cm de l'extrémité anodique, sur une longueur de 20 cm.

La séparation est très bonne comme le montre la figure 13.

Après migration, une bande témoin de 2 cm de large est découpée et révélée (fig. I4).

Il apparaît ainsi plusieurs taches représentant des groupes d'acides aminés.

- un groupe constitué par des amines. (BISERTE 1958).
- un groupe d'acides aminés à comportement basique.
- une tache constituée uniquement par l'acide γaminobutyrique.
- un groupe constitué par la βalanine et le "T-spot", ou acide βaminoisobutyrique.
- un groupe d'acides aminés à comportement neutre.
- un groupe d'acides aminés à comportement acide.
  (acide αaminoadipique, acide glutamique, acide aspartique).

Après séparation sur l'électrophorégramme des zones correspondantes à ces taches, nous les éluons par de l'acide acétique à 5%, sous cloche hermétiquement close, entre deux lames de microscope -- pendant 24 h. La migration du solvant se fait par capillarité entre les deux lames maintenues serrées -- par une pince, selon le dispositif précédemment décrit.

Après élution et séchage des bandes de papier, la révélation à la ninhydrine a montré que l'élution était totale.

Nous obtenons ainsi plusieurs groupes d'acides aminés correspondant à 100 mg de poudre.

Ils sont chacun évaporés dans un tube à essai à l'évaporateur rotatif à 40°C.

Electrophorèse préparative des acides aminés aromatiques :

Nous réalisons la même technique en partant de l'extrait pigmenté brun-rouge contenant les acides aminés aromatiques.

Après migration, il apparaît que ces pigments se sont séparés en deux groupes : des pigments verts qui migrent entre l'acide glutamique et le groupe des acides aminés "neutres", mais juste au contact de ces derniers ; et des pigments rouges qui migrent entre le groupe d'acides aminés "neutres" et l'acide-γ aminobutyrique, comme le montre la figure 15.

Après révélation d'une bande témoin, et élution des zones correspondantes aux taches, nous obtenons ainsi les acides aminés neutres aromatiques entièrement dépigmentés, correspondant à 100 mg de poudre. Ils sont alors évaporés à sec dans un tube à essai, à l'évaporateur rotatif à 40°C.

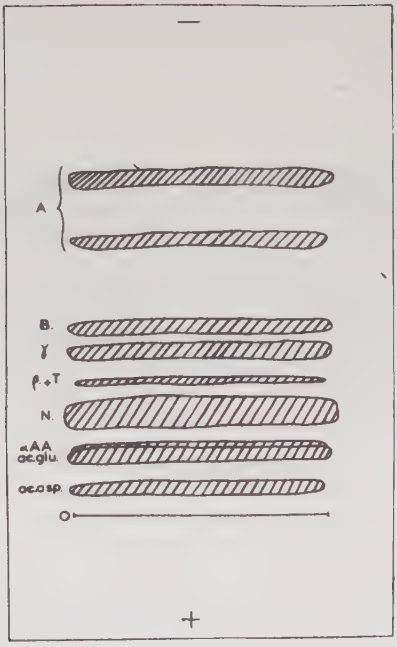


Figure 13

A. = amines
B. = Basiques
γ = acide γ aminobutyrique
β = βalanine
T. = acide βamino isobutyrique
N. = Neutres
αAA. = acide αamino adipique
ac. glu. = acide glutamique
ac. asp. = acide aspartique

Acides aminés à comportement acide :

Comme le montre la figure 16, qui représente une vingtaine d'expériences, nous avons séparé l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide γ aminoadipique, et il apparaît une tache X non définie actuellement.

Ayant d'autre part déposé quelques autres fractions, nous reconnaissons la place des "Neutres" et des "basiques", la présence de l'acide γ aminobutyrique en grande quantité, la présence de βalanine en très faible quantité, et peut-être la présence d'acide β aminoisobutyrique à l'état de traces.

Acides aminés à comportement neutre :

Nous avons séparé 12 acides aminés, aliphatiques et aromatiques, dont les Rf en seconde dimension sont inscrits dans le tableau ci-dessous et dont la séparation est représentée sur la figure 17.

Asparagine	:	0,38
Glutamine	:	0,44
Glycine	:	0,45
Sérine	:	0,46
Thréonine	:	0,53
Alanine	:	0,56
Proline	:	0,59
Tyrosine	:	0,62
Valine	:	0,70
Phénylalanine	:	0,72
Leucine et isoleucine	:	0,77

Volume déposé : 200 µl. (correspondant à 100 mg de poudre).

Figure 14

A. = amines
B. = basiques
γ = acide γaminobutyrique
β = βalanine
T. = acide βamino isobutyrique
N. = neutres
αAA. = acide αamino adipique
ac. glu. = acide glutamique
ac. asp. = acide aspartique

Figure 15

γ. = acide γaminobutyrique
P.R. = Pigments rouges
N. = Neutres
P.V. = Pigments verts

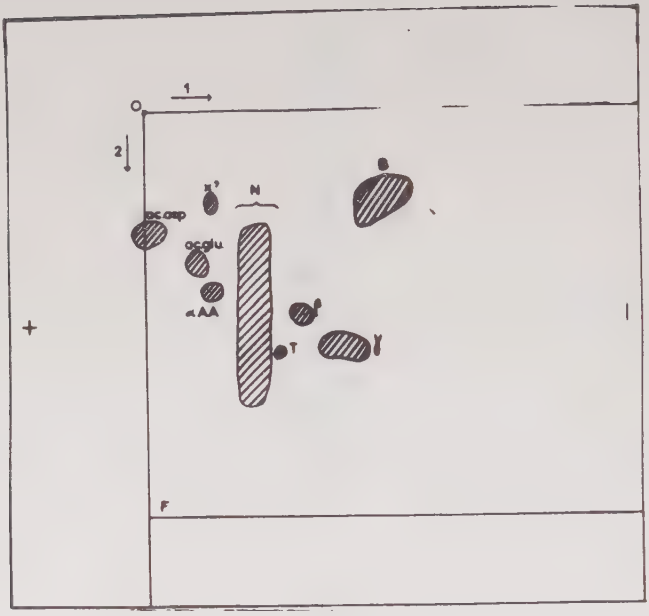


Figure 16

N. = neutres
γ. = acide γaminobutyrique
T. = acide βamino isobutyrique
β. = βalanine
αAA. = acide αamino adipique
ac. glu. = acide glutamique
ac. asp. = acide aspartique
X. = corps non défini
B. = Basiques

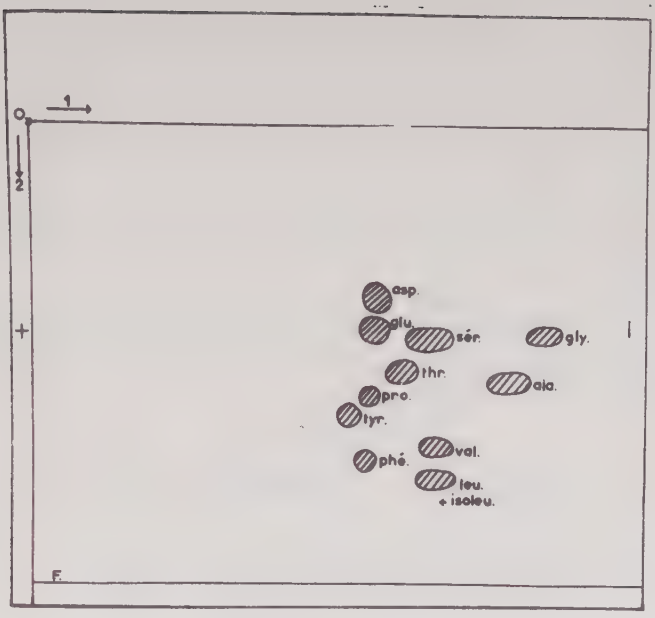


Figure 17

isoleu. = isoleucine
leu. = leucine
phé. = phénylalanine
val. = valine
tyr. = tyrosine
pro. = proline
ala. = alanine
thr. = thréonine
sér. = sérine
gly. = glycine
glu. = glutamine
asp. = asparagine

(Cette figure représente une vingtaine d'ex
périences).

(La méthionine et le tryptophane, indiqués-
par l'autoanalyseur, sont en trop faible quantité ---
pour être décelés ici).

Acides aminés à comportement basique :

Par électrophorèse bidimensionnelle, nous -
séparons à partir des extraits, l'arginine, la lysine
et des traces d'histidine (figure 18).

De plus, si nous ajoutons à cette fraction,
celle de l'acide γaminobutyrique, il est évident que-
cet acide est présent en grande quantité ;si d'autre-
part, nous ajoutons la fraction correspondant à la β
alanine et à l'acide βaminoisobutyrique, il apparaît-
que la βalanine est parfois présente à l'état de tra-
ces et peut-être l'acide βaminoisobutyrique à l'état-
de très faibles traces.

(Volume déposé : 200 µl. correspondant à --
100 mg de poudre de feuilles).

Remarque : En outre, la chromatographie en-
couche mince (MUNIER 1965), et surtout les résultats-
de l'autoanalyseur d'acides aminés, nous ont montré -
la présence de traces de tryptophane, de méthionine en
faible quantité, la présence à la fois de leucine et-
d'isoleucine, et la présence de quelques taches encore
non définies.

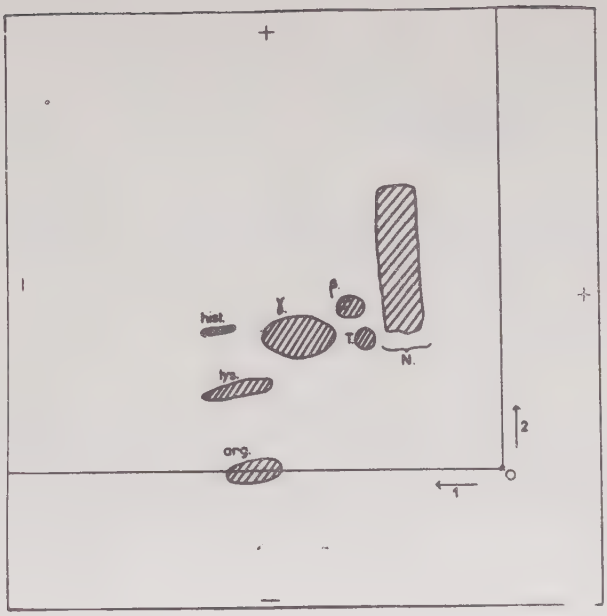


Figure 18

N. = Neutres
β. = βalanine
hist. = histidine
γ. = acide γaminobutyrique
T. = acide βamino isobutyrique
lys. = lysine
arg. = arginine

2. CONCLUSIONS.

La validité de notre technique est relativement aisée à démontrer puisque nous pouvons la comparer à la fois aux diverses méthodes essayées au cours de nos recherches et à celles utilisées par d'autres auteurs (BISERTE 1958).

Par contre, l'interprétation des résultats qualitatifs est plus délicate car la confrontation avec les travaux d'autres chercheurs est impossible, l'étude qualitative des acides aminés libres du *Vinca minor*, du *Vinca major*, et du *Vinca media* n'ayant jamais été entreprise, à notre connaissance, avant nos propres recherches.

Nous avons mis en évidence dans les feuilles du Vinca major, les acides aminés libres suivants : acide αamino adipique, acide γamino-butyrique, acide aspartique, acide glutamique, βalanine, alanine, arginine, asparagine, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine.

Ces acides sont visibles sur les photographies des chromatoélectrophorégrammes insérés précédemment.

Certains se trouvent en très faible quantité (acide αamino adipique, βalanine) mais sont cependantdécelables par chromato-électrophorèse ; d'autres sont à l'état de si faibles traces qu'ils sont à peine perceptibles (acide βaminoisobutyrique), ou mêmetotalement invisibles après révélation d'un chromato électrophorégramme par le réactif à la ninhydrine (méthionine, tryptophane).

La cystine n'a jamais été révélée.

Dans les feuilles du Vinca minor et du Vinca media, les acides sont semblables, et seule l'importance quantitative varie ; il en est de même chez les fleurs des trois espèces, où la βalanine, et l'acide βaminoisobutyrique semblent en plus grande quantité que dans les feuilles et chez les boutons floraux où la présence de méthionine est décelable.

Dans les racines, les variations entre les trois espèces de Pervenches sont aussi minimes que dans les feuilles et les fleurs. Par contre les racines semblent avoir une concentration en acides aminés bien moindre que les autres organes ; *la proline, en particulier, est presque inexistante etc'est l'asparagine qui semble l'acide aminé le plus important.*

Les feuilles, les racines, les fleurs et les boutons floraux des pervenches étudiées renferment donc au moins 23 acides aminés plus ou moins abondants.

Certains sont presque inexistants (tryptophane); alors que d'autres semblent en quantité très importante (alanine, acide γ amino butyrique, asparagine).

- Il faut remarquer d'abord le nombre relativement important d'acides aminés libres dans les espèces à l'étude. Il faut remarquer également l'extrême faiblesse du taux de tryptophane, qui pourrait être due à des pertes au cours de la décoloration sur charbon actif, mais des pertes semblables se produisent sur les colonnes de résines échangeuses d'ions habituellement utilisées, si bien que ce détail de techniques n'explique pas ce taux extrêmement bas de tryptophane (OPIENSKA-BLAUTH 1962).

- Il faut remarquer d'autre part la grande importance quantitative de l'acide γaminobutyrique.

- La présence et l'importance relative de- l'alanine et des amides peuvent s'expliquer aisément par l'action des processus transaminasiques (KRETO-- VICH 1962, MORGUNOVA 1964), et la présence d'acide γ aminobutyrique est due à la décarboxylation de l'a-- cide glutamique. Des études enzymologiques sur ces-- poudres nous ont permis en effet de mettre en éviden ce la L-glutamate-1-carboxylyase (4.1.1.15).

Nous nous proposons d'aborder ultérieure-- ment son étude quantitative. Sa présence explique en partie la faible quantité d'acide glutamique qui est décarboxylé dans une certaine mesure dès son appari- tion.

- L'absence presque totale de tryptophane, -- considéré comme un des rouages essentiels de la syn-- thèse des alcaloïdes des Pervenches, est peut-être -- due également à son utilisation rapide au fur et à me sure de la biosynthèse.

- Ces résultats sont en accord avec ceux de - nombreux auteurs ; nous pourrions mentionner les ex-- périences réalisées sur certains Tabacs, sur de nom-- breuses légumineuses et sur de très nombreux autres-- végétaux, mais il est préférable d'établir des compa- raisons à l'intérieur d'une même famille.

Ainsi les résultats obtenus très récemment- sur les différents organes du Rauwolfia serpentina -- Benth. (MADAN 1967) montrent que le contenu en acides aminés de cette espèce de Rauwolfia est très voisin-- de celui des espèces de Vinca que nous avons étudiées.

Si MADAN ne trouve pas d'histidine ni de gly cine chez le *Rauwolfia serpentina*, il trouve par con-- tre tous les autres acides aminés mis en évidence dans les différents organes des Pervenches indigènes.

De plus, la cystine et le tryptophane sont absents de tous les organes aussi bien chez cette espèce de Rauwolfia que chez les Pervenches indigènes.

Dans les deux cas cependant, la présence-- et les variations des acides aminés (sauf la proline dans les racines de Pervenches), sont presque identiques selon les organes, qu'il s'agisse des racines, des tiges, des feuilles, des fleurs ou des fruits.

MADAN a étudié, d'autre part, les acides-- aminés liés, après hydrolyse acide.

Les résultats sont sensiblement différents par suite de la disparition de l'asparagine, de la-- glutamine, et de l'acide γ amino butyrique, tandis-- que la cystine et le tryptophane semblent en quantité notable. Il faut remarquer également ici que la présence et les variations des acides aminés sont les-- mêmes dans tous les organes.

En résumé, on observe que les espèces de - Vinca étudiées présentent une composition des acides aminés libres relativement homogène et que les différences ne semblent devoir s'observer qu'en ce qui -- concerne les variations de l'importance relative de-ces divers acides selon les stades de développement- de ces espèces et variétés.

Cette constatation a une importance certaine en chimiotaxinomie : elle indique qu'il ne faut - pas chercher dans l'inventaire qualitatif des acides aminés une contribution à l'identification et à la-- classification de ces trois Pervenches.

CHAPITRE II

ETUDE QUANTITATIVE

TRAVAUX ANTERIEURS

- Le dosage des acides aminés des Perven-- ches indigènes n'a fait l'objet d'aucune étude avant celle-ci.

- Les méthodes d'études des acides aminés- des végétaux ont été très améliorées par l'utilisa-- tion, dans les laboratoires de recherche, d'appareils automatiques de séparation sur colonne et de dosage- colorimétrique des acides aminés (CORMIER 1967).

Mais, bien avant leur apparition, des tra-- vaux avaient permis d'élucider de nombreux problèmes- se rapportant au métabolisme des acides aminés chez-- les végétaux.

Parmi les revues publiées à ce jour, nous citerons celles de Miettinen (1955), de Kato (1957), de Virtanen (1957), de Steward et Pollard (Steward 1957) de Kaniuga (1959), de Fowden (1959, 1962 et 1964), de Larsen et Kjaer (Larsen 1960), de Pleshkov (1961), de Tschierch (1962), de Prsybylska (1963), et surtout la revue très complète et très détaillée de Steward et Durzan (Steward 1965).

Il suffit de consulter l'article de ces derniers auteurs pour avoir tous les renseignements concernant l'historique et les travaux antérieursaux années 1963-1964, portant sur le métabolisme, la nature chimique, la détermination et le dosage des composés azotés, et en particulier des acides aminés.

Notre propos consiste donc seulement à résumer les différents types de détermination et de dosage des acides aminés, ainsi que les progrès réalisés au cours de ces quatre dernières années dans les techniques chromatographiques qui permettront de doser les acides aminés libres des végétaux supérieurs.

- Plusieurs principes de méthodes sont utilisés:

Des méthodes de détermination histo-chimique sur matériel végétal (Saljaev 1961), des méthodes enzymologiques (Brenner 1960), des méthodes microbiologiques pour déterminer certains acides aminés par un dosage spécifique (Gautier 1962), Mastropietro-cancellieri 1963, Pluschkat 1964, Moore 1964, Wozniak 1965, Sebek 1965).

Des méthodes chimiques et physiques telles que la détermination des acides aminés sous forme de complexes cuivriques (Baudet 1955, Gauthier 1962), ces complexes pouvant être dosés par polarographie automatique (Corfield 1961), ou en éliminant le cuivre avant le dosage selon le procédé de Fazakerley et Best qui consiste à faire passer le mélange d'acides aminés sur une colonne de Séphadex G-25 complexée avec du sulfate

de cuivre ; les acides aminés retenus sont élués par l'acide chlorhydrique et le cuivre est éliminé par le diéthyldithio carbamate (Fazakerley 1965).

Des membranes échangeuses d'ions ont permis de séparer des groupes d'acides aminés (Takai 1965).

Des déterminations polarimétriques (Brenner 1960), potentiométriques (Vigneron 1960, Wiesner de O' Hanna 1963), et polarographiques (Vesela 1964) ont également apporté des résultats ainsi que la spectrophotométrie en ultra-violet (Wetlaufer 1962).

N'oublions pas de mentionner des techniques très récentes de dosage après séparation chromatographique sur papier ou sur couche mince, telles que la spectrofluorométrie (Boulton 1964, Lioret 1964, Stanley 1965), la radiochromatographie (Collet 1964), et la réflectance spectrale (Frodyma 1965).

Les chromatographies sur papier ou sur couche mince peuvent permettre également des dosages colorimétriques par photométrie directe des taches colorées ou après élution de ces taches.

Quant à la chromatographie en phase gazeuse, les expériences récentes sont extrêmement nombreuses (Anders 1963, Teuwissen 1963, Winter 1964, Karmen 1964, Cruickshank 1964, Murai 1964, Blau 1965, Gil-Av 1965, Marcucci 1965, Halasz 1965, Gehrke 1965, Shlyapnikov 1965, Halpern 1965), car cette technique présente un grand intérêt par sa rapidité, sa sensibilité, et son pouvoir séparateur très élevé, mais selon l'avis de Jutisz et De La LLosa (Jutisz 1963), et de Potteau (Potteau 1965), il ne semble pas que la chromatographie en phase gazeuse permette actuellement d'effectuer une analyse quantitative suffisamment précise de tous les acides aminés.

Pourtant, en modifiant les conditions d'injection dans le chromatographe, Stalling et Gehrke (Stalling 1966) ont pu obtenir une séparation quantitative,

sans décomposition thermique des acides aminés, y compris l'arginine et le tryptophane, préalablement transformé en esters n-butyl-N-trifluoro-acétyl correspondants.

Citons, d'autre part, des techniques modernes et très importantes de détermination structurale, telles que la spectroscopie et la spectrométrie de masse (Bieman 1960 et 1961, Manusadzhyan 1965), et la résonance magnétique (Fowden 1959, Abraham 1962, Gray 1962).

Il est clair qu'il ne s'agit ici que de présenter les plus récentes et intéressantes techniques employées dans la détermination et le dosage des acides aminés depuis quelques années, puisque l'historique et le progrès des méthodes chimiques, biologiques enzymatiques, et microbiologiques furent traités en 1962 par Latiner (Latiner 1962).

Il convient cependant d'insister au sujet des techniques chromatographiques sur colonne puisque leur développement est directement responsable de l'extension qu'à prise l'étude du métabolisme des acides aminés.

Dès 1950, Stein et Moore (Stein 1950) ont réussi à séparer les acides aminés sur des colonnes de résines échangeuses d'ions (Dowex) à l'aide de tampons dont les pH et les températures varient au cours de l'analyse.

En 1958, les mêmes auteurs, en collaboration avec Spackman, utilisent des colonnes d'amberlite, (Moore 1958), puis mettent au point un appareil de séparation et de coloration des acides aminés entièrement automatique. (Spackman) (1958).

Depuis cette date, de nombreuses modifications ont été proposées, soit en ce qui concerne les méthodes de colorimétrie par un réactif à la ninhydrine, soit en ce qui concerne la séparation sur colonne.

Le procédé de Piez et Morris (Piez 1960) a - apporté un progrès certain ; l'élution des acides aminés est faite à une température déterminée, et au-moyen d'un gradient linéaire de pH, réalisé en mélan geant les tampons appropriés dans un dispositif particulier comportant neuf chambres, appelé "varigrad".

- Jutisz, en 1960 (Jutisz 1960), puis plus - tard, en collaboration avec De La LLosa (Jutisz 1963) a fait le point de nos connaissances antérieures à - 1963, se rapportant à ces techniques d'analyses.

Des progrès techniques importants furent réa lisés depuis cette année pour améliorer la rapidité- et la facilité d'emploi des séparations d'acides ami nés en continu par chromatographie sur colonne (Lain 1966).

Ce procédé, le meilleur actuellement pour sé parer chaque acide aminé d'un mélange très complexe, est également employé pour la séparation des gluci-- des et des acides organiques (Dilov 1959), ce qui -- est très intéressant pour étudier les interrelations du métabolisme de ces différents composés (Yemm 1965).

- Deux appareils sont actuellement bien connus et permettent sensiblement les mêmes séparations de précision.

L'un est un appareil formé d'un seul bloc et spécialisé ; il s'agit de l'autoanalyseur d'acides a minés "Beckman", inspiré directement de la technique de Moore, Spackman, et Stein (Spackman 1958).

L'autre est un appareil constitué d'une partie analytique pouvant servir dans de nombreux dosages très différents, et d'un ensemble de pièces déta chées que l'on peut modifier selon les besoins de la méthode, ce qui permet une automatisation très poussée ; il s'agit de l'appareil "Technicon", inspiré- plus précisément de la variante de PIEZ et MORRIS --

(PIEZ 1960), perfectionnée par P. HAMILTON (HAMILTON-1963 et 1966), et utilisant un système à gradient d'élution hydrostatique, mis au point par E.A. PETERSON-et H.A. SOBER (PETERSON 1959), qui permet de réduire-le nombre des colonnes de 2 ou 3 à une seule, donc de diminuer la taille de l'échantillon (BONNAFE 1965).

- De nombreux auteurs ont cherché à améliorer les appareils (HAMBRAEUS 1963, SPACKMAN 1963 et 1964) les résines, de plus en plus sphériques et calibrées-(BONNAFE 1964, JACOBS 1963, BENSON 1965), les colonnes, en agissant sur leur largeur, (GONZALES CADAIRD-1964), parfois très petite pour l'ultramicroanalyse-- (KIRSTEN 1964, HAMILTON 1965), et sur leur contenu -- (WIERZCHOWSKI 1964), et ont essayé également d'améliorer les méthodes pour mieux séparer tel ou tel acide-aminé (KIRKPATRICK 1964, BURNS 1965, ORESKES 1965).

Les recherches dans l'automatisation sont également très poussées : il existe un dispositif automatique, dans le cas des appareils "Technicon" permettant d'introduire, au moyen d'une seringue, une quantité connue d'échantillon dilué dans du saccharose.-- Ce mélange étant plus dense que le tampon, l'échantillon est ainsi déposé à la surface de la résine sans-- la perturber (BONNAFE 1964).

Il faut noter ici un détail d'une très grande importance pour la manipulation : la présence dans le bain-marie des appareils "Technicon" de deux bobines-de verre de grand diamètre interne (2 mm) si bien --- qu'il permet la segmentation par l'azote, et surtout-d'éviter les blocages par précipitation de la ninhydrine (BONNAFE 1963).

Le débit d'élution peut être accru, tout en-- maintenant une bonne résolution ;

Il existe alors un danger de colmatage par -- augmentation des pressions car l'accroissement du débit d'élution implique une diminution de la taille--- des grains de résine ; il en résulte un accroissement de la résistance opposée par la colonne au flux de--- tampons.

Actuellement, les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant des résines formées de polymères de polystyrène sulfoné avec 8,5% de chaînes latérales de divinylbenzène, parfaitement sphériques, d'un diamètre uniforme de 17 à 18 microns, et des colonnes assez courtes et étroites (0,636 cm x 125 cm) ; la pression est alors de 450 p.s.i. (HAMILTON 1963 et 1966, KING 1964, MASON 1965).

- Des petits peptides sont souvent extraits en même temps que les acides aminés et il est parfois délicat de les différencier sur un même chromatogramme. D'ordinaire, il faut faire 2 analyses pour détecter ces peptides, l'une avant et l'autre après hydrolyse, d'où il résulte une perte de temps importante.

Catravas a mis au point et adapté sur l'appareil "Technicon" une méthode automatique pour séparer hydrolyser et détecter les peptides (Catravas 1964 et 1965).

Les substances étudiées subissent une hydrolyse alcaline (100°C, 70 minutes, NaOH 3,3 N) au fur et à mesure de leur élution et elles sont analysées simultanèment à la ninhydrine, avant et après hydrolyse. En comparant le double enregistrement simultané des pics, dans les mêmes proportions, avant et après hydrolyse, on décèle immédiatement les peptides sur le chromatogramme car leur pic augmente de surface après hydrolyse du fait des groupes NH_2 libérés, réagissant fortement à la ninhydrine (Bonnafé 1965, Catravas 1964 et 1965).

On identifie mieux ainsi les acides aminés et on peut même améliorer cette identification en mesurant les rapports de surface à 440 nm et à 570 nm. (Bonnafé 1966, Hori 1966).

- Un autre problème consiste dans la récupération des acides fractionnés. Il faut pouvoir éliminer les tampons par évaporation ou lyophilisation, or la-

méthode de Moore, Spackman et Stein (Moore 1958), -- ainsi que celle de Piez et Morris (Piez 1960), utili sent un tampon à base d'acide citrique et surtout de citrate de sodium qui est difficile à éliminer, ce-- qui limite considérablement leur emploi dans l'étude du métabolisme des acides aminés au moyen d'élèments radioactifs.

D'autres chercheurs (Padieu 1963, 1964, 1965) utilisant un système analogue de chromatographie, mi rent au point différents systèmes de tampons volatils à base d'acétate de pyridine et d'acide acétique (a- daptés par DELARUE pour des colonnes de 0,600 cm x 140 cm (Delarue 1966), et utilisèrent un détail tech nique de l'appareil "Technicon" permettant de collec ter les fractions et de les distribuer d'une manière automatique dans le système analytique (Bouillet --- 1965).

Cette expérience pourrait également être réa lisée avec un appareil "Beckman" modèle 120 B, qui-- peut être équipé d'un collecteur de fractions avec a nalyse simultanée à la ninhydrine.

L'emploi de ces tampons volatils permet de-- nombreux dosages très intéressants de chaque acide a miné après séparation sur colonne ; un procédé d'ana lyse fluorométrique automatique fut mis au point et- adapté à l'autoanalyseur "Technicon" (Hill 1964) ; - et la mesure de la radioactivité de chaque acide ami né, après séparation sur colonne, peut être réalisée d'une manière rapide.

J.L. MAUGAN a monté directement en série,--- dans le circuit de sortie de colonne, une cuve à --- flux continu d'un compteur à scintillation à anthra- cène (Bonnafé 1965). Cette mesure en continu de la-- radioactivité après séparation sur colonne, est une- technique déjà assez employée (Elwyn 1964, Blaedel-- 1964, Schormueller 1965).

Quant à PADIEU et MALEKNIA, ils utilisèrent- un dispositif adapté à l'appareil "Technicon" per---

mettant de doser les acides aminés sur une partie aliquote de l'effluent et de mesurer la radioactivité spécifique avec un compteur de scintillation sur une autre partie aliquote (Padieu 1966).

Précisons que l'adaptation d'un compteur à scintillation avec ou sans analyse à la ninhydrine est également parfaitement réalisable sur le modèle "Beckman" 120 B.

Les comptes des désintégrations peuvent être éventuellement effectués à l'aide d'un intégrateur.

- Un dernier problème, et non des moindres, est le temps perdu par le chercheur à faire les calculs des chromatogrammes, c'est-à-dire à compter les points, à calculer la mi-hauteur du pic et à déterminer par l'arithmétique la surface délimitée par la courbe. D'autres méthodes manuelles plus ou moins rapides existent également (Tempé 1966) mais depuis quelque temps, des calculateurs automatiques ont été mis au point (Fraser 1964, Porter 1964, Graham 1965, Krichevsky 1965), tels que l'intégrateur semi-automatique "Technicon" qui permet d'obtenir très rapidement des résultats exacts, corrigés (corrections du standard interne, de la quantité d'extrait, de la ligne de base) en micromoles, sans calcul, par simple lecture directe (Bonnafé 1965).

Cette automatisation de plus en plus poussée permet d'obtenir des résultats à la fois très précis et très rapides et donne au chercheur le temps de discuter les conclusions de ses expériences, et d'en établir les conséquences.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

A) CHOIX DES TECHNIQUES.

I. EXTRACTION.

Pour l'analyse quantitative à l'aide d'un autoanalyseur automatique d'acides aminés, l'extraction des acides aminés aliphatiques et aromatiques se fait selon les mêmes principes que pour l'analyse qualitative mais d'une part on réunit les deux élutions puis que les pigments, en faible quantité, ne gênent guère le passage sur les résines échangeuses d'ions, et --- d'autre part les quantités de produits utilisés va--- rient.

Nous partons de 600 mg de poudre, l'extrac--- tion se fait dans une fiole conique de 500 ml avec--- 100 ml de solvant et les lavages utilisent 50 ml de-- solvant chacun, et 0,50 ml de HCl N pour les deux der niers.

La quantité de solution acétique versée sur-- la colonne de charbon correspond à 400 mg de poudre.

L'extrait sec obtenu selon le processus utili sé pour l'analyse qualitative est étudié selon les--- deux techniques les plus employées (MOORE 1958 et --- PIEZ 1960), à l'aide des appareils analyseurs d'aci-- des aminés Beckman et Technicon.

2. DOSAGE.

- Dans le cas de l'autoanalyseur Beckman, --- type 120 B, on reprend l'extrait sec quantitativement

par de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 20 ml, puis on reprend 4 ml que l'on ajuste avec du tampon--- citrate de sodium à pH 2,2 dans une fiole de 10 ml ;-- puis on dépose 4 ml de cette solution tamponnée sur--- chaque colonne ; on suit ainsi la technique classique- de Moore et Stein (Moore 1954 et 1958).

Nous utilisons, à la température de 50°C, une colonne de 15 cm avec un tampon d'élution de pH 5,28-- pour les acides aminés à comportement basique, et une- colonne de 180 cm avec 2 tampons successifs de pH 3,28 et 4,25 pour les acides aminés à comportement neutre-- et acide, puis, à la température de 30°C, nous utili-- sons la même colonne de 180 cm avec le même tampon à-- pH 3,28 pour séparer la sérine des amides (Asparagine- + glutamine) et une colonne moyenne, d'environ 60 cm,- éluée à pH 4,26 pour l'ornithine et surtout l'acide γ- aminobutyrique.

Le principal inconvénient de cette technique- très utilisée et classique à l'heure actuelle consiste dans l'utilisation de tampons non volatils, passant--- brusquement d'un pH à un autre, et surtout dans l'uti- lisation de plusieurs colonnes, si bien que le temps-- de l'analyse d'un extrait végétal complexe s'en trouve augmenté et qu'il nous fallait 48 H pour avoir un ré-- sultat complet.

- Dans le cas de l'autoanalyseur Technicon,-- on reprend l'extrait sec quantitativement par HCl 0,1- N dans une fiole jaugée de 5 ml, puis on prélève 1 ml- de cette solution que l'on mélange à 1 ml d'une solu-- tion de Norleucine à 2,5 µmole/ml, et à 0,50 ml de gly cérol à 50%. (Dans le cas d'un étalonnage, on remplace l'extrait par 1 ml d'une solution standard à 2,5 µmole de chaque acide aminé par ml).

Les acides aminés sont ainsi en solution dans du glycérol à 10%.

On prélève à la seringue 0,25 ml de cette solution que l'on dépose sur la colonne. On lave et on remplit le haut de la colonne avec un tampon citrate de sodium à pH 2,875.

Ce tampon, sous pression, pousse les acides aminés dans la résine car la solution de glycérol est plus dense que le tampon.

Nous suivons une variante de la technique de M. Efron (1965) : la colonne, de 140 cm sur 0,635 cm, contient de la résine chromobeads type A (22 microns), la température est stabilisée à 35°C, au début de l'analyse pendant 2 H 30 puis à 60°C pendant la suite de l'expérience qui se réalise en 22 heures.

Les tampons d'élution, qui ont un débit de 30 ml/heure, sont définis ainsi :

- tampon citrate de sodium 0,05 M ; pH 2,875.
- tampon citrate de sodium 0,267 M ; pH 4,740.

Ce tampon est 0,8 M en sodium, mais uniquement avec le citrate de sodium sans Na Cl.

La composition des chambres de l'autograd est la suivante :

- chambres 1 à 5 : 75 ml de tampon pH 2,875.
- chambre 6 : 15 ml de tampon pH 2,875.
  + 60 ml de tampon pH 4,740.
- chambres 7 à 9 : 75 ml de tampon pH 4,740.

Les avantages de cette méthode sont les suivants :

L'ammoniaque est retardée et sort après la β-alanine, l'acide β amino-isobutyrique, l'acide γ amino

butyrique, et l'homocystine qui sont bien séparés.

La lysine, l'histidine et les méthylhistidi-- nes sont bien séparés.

- Nous pourrions discuter la valeur comparée- de la technique que nous avons adoptée par rapport aux diverses modifications portant sur les longueurs de co lonne, les températures, les débits de tampons, les--- temps d'élution, le nombre des tampons et l'échelonne- ment de leur pH, mais il nous a semblé que ces varian- tes sont maintenant bien connues et qu'elles sont em-- ployées, selon les cas, pour des problèmes de sépara-- tion bien déterminés. Aussi avons-nous préféré présen- ter ces variations plutôt comme des élèments d'intro-- duction à l'étude des techniques quantitatives de sépa ration et de dosage des acides aminés, que comme des-- élèments de discussion puisque les qualités et les dé- fauts de chacune sont actuellement évidents pour tout- usager de ces méthodes.

La technique de M. Efron et la coloration à-- la ninhydrine convenant au but que nous nous sommes fi xés, nous n'avons pas essayé la technique de colora--- tion récente à l'acide naphtoquinone sulfonique et à-- l'acide trinitrobenzène sulfonique préconisée par ---- Hochstrasser (HOCHSTRASSER 1966).

Toutefois, certains inconvénients de la tech- nique de M. EFRON nous sont apparus à l'usage, en com- parant nos résultats à ceux que nous avions déjà obte- nus avec les mêmes prélèvements à l'aide de l'autoana- lyseur d'acides aminés Beckman.

Ces inconvénients ne semblent pas avoir été-- prévus par M. EFRON ni décelés par P. ROBIN (1967) qui utilise cette méthode.

L'inconvénient majeur que nous avons découvert et montré réside dans le fait que la technique de M. EFRON n'est pas quantitative en ce qui concerne la glutamine.

La glutamine est bien séparée par cette technique quand elle se trouve en quantité très importante dans les prélèvements, sinon sa présence n'est pas décelable.

Cet acide aminé est en effet détruit dans une très large proportion (environ 80%) au cours de son passage sur la colonne à 60°C ; il n'est élué en effet que 4 H 30 à 5 H après le début de la chromatographie ; il reste donc au moins 2 H, sinon plus, sur la colonne lorsque la température de celle-ci est amenée à 60°C.

Ces résultats ont été obtenus en effectuant un ensemble de chromatographies, soit entièrement à 30°C, soit entièrement à 60°C, soit encore en ne portant la température de la colonne à 60°C qu'après l'enregistrement du pic de la glutamine.

Il n'y a pas de modifications du taux d'acide glutamique, mais une élévation du plateau d'ammoniaque semble apparaître à 60°C.

Nous ne pourrons donc doser la glutamine que lorsque cet acide aminé sera en grande quantité dans les prélèvements, et les résultats chiffrés publiés ne le seront qu'à titre de comparaison entre les diverses récoltes, et ne devront pas être jugés en valeur absolue.

D'autre part, des expériences réalisées selon le même principe nous ont permis de constater que l'asparagine perdait environ 20% de sa valeur au cours de son passage sur la colonne à 60°C.

De plus, cette amide est bien séparée de la glutamine mais ne l'est pas de la sérine ;

Elle constitue même la majeure partie du pic formé par ces deux composés aminés.

Ces résultats prouvent que toute technique de chromatographie d'acides aminés réalisée à 60°C est impropre à doser l'asparagine et surtout la glutamine.

Or, toutes les chromatographies sont actuellement réalisées à 50 ou 60°C.

Il serait donc nécessaire de réaliser deux expériences, l'une à une température voisine de 60°C et l'autre à une température voisine de 35°C.

Toutefois, au moment où nous terminons ce travail, il semble qu'une technique permettant de séparer quantitativement, l'asparagine, la glutamine, et les principaux acides aminés connus, ait été mise au point sur un appareil Beckman ; l'élution réalisée par des tampons au citrate de Lithium est effectuée entièrement à la température de 37°C. (BENSON 1967).

B) RESULTATS

I. CHOIX DE L'HEURE DES PRELEVEMENTS.

Dans un premier temps, la planimétrie des taches d'une électrophorèse préparative à pH 3,9 nous a permis d'évaluer les variations quantitatives globales des acides aminés *au cours d'une journée.*

Nous avons réalisé ces essais sur le *Vinca major* au mois de février pour avoir les plus fortes variations possibles entre les phases de pénombre et froides du matin et du soir et les phases ensoleillées et relativement plus chaudes du milieu de la journée.

Les courbes ci-dessous, présentées à titre d'exemple, obtenues avec un planimètre "Photovolt", indiquent à l'évidence que les prélèvements de 9 H sont les plus faibles en acides aminés ; le prélèvement réalisé à 11 H renferme une quantité très supérieure d'acides aminés, mais nettement inférieure à celle du prélèvement de 14 H.

Il faut attendre 16 H 30 pour voir la quantité globale d'acides aminés atteindre un palier qui se maintient ou même augmente mais très légèrement dans le prélèvement de 19 H.

Les variations du *Vinca minor* et du *Vinca media* sont du même ordre.

Tenant compte de ces essais, nous avons réalisé par la suite tous nos prélèvements à 19 H ou à la tombée de la nuit en hiver, sauf en février, avril et juin 65 où les prélèvements réalisés également à 9 heures nous ont permis d'étudier d'une manière précise les variations quantitatives de chaque acide aminé à la fin de la période obscure et à la fin de la période lumineuse de leur cycle journalier.

D'autre part, pour des raisons de commodité d'écriture, nous mentionnons les différents prélèvements en fonction des mois, mais il est évident que selon les années plus ou moins chaudes ou pluvieuses, un même mois peut ne pas correspondre au même stade de végétation ; nous préciserons cet état de fait dans la discussion des résultats.

2. UTILISATION DE L'AUTOANALYSEUR BECKMAN.

DOSAGES DES DIFFERENTS ACIDES AMINES AU COURS DE LA VEGETATION DANS LES FEUILLES DU *VINCA MINOR* ET DU *VINCA MAJOR* PENDANT LES ANNEES 1965 et 1966.

- Nous avons dosé les acides aminés des --- feuilles du *Vinca major* et du *Vinca minor*.

- La première récolte du *Vinca minor* eut--- lieu en mars 1964 et nous avons effectué des prélèvements des trois Pervenches en mai 1964.

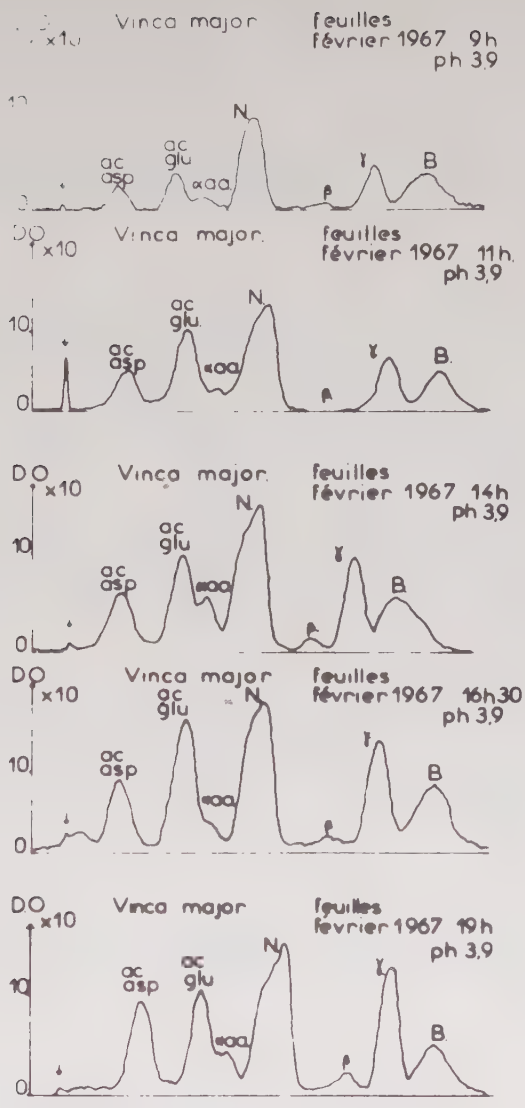
Les résultats des dosages apparaissent dans les tableaux I, II et III.

- D'autre part, en 1965, nous nous sommes-- attachés à étudier les variations du taux des aci-- des aminés au cours de la journée, sur les feuilles du *Vinca minor* et du *Vinca major* récoltées à 9 H et à 19 H en février, avril et juin.

Les résultats des dosages correspondants--- apparaissent dans les tableaux IV et VII.

- Enfin, en 1966, les récoltes des trois--- Pervenches ont été réalisées vers le quinzième jour de chaque mois, à 19 H ou à la tombée de la nuit en hiver.

Nous avons dosé, avec cet appareil, les récoltes de feuilles de 1966, de mars à juillet pour-le *Vinca minor* et de mars à septembre pour le *Vinca major*.



Variations des acides aminés en fonction de l'heure des prélèvements

↓ : Point de départ

ac asp. : acide aspartique.

ac. glu. : acide glutamique.

α aa : acide α aminoadipique

N : neutres.

β : β alanine.

γ : acide γ aminobutyrique

B : basiques.

Dosages des acides aminés au cours de l'année 1964 :

Les dosages des acides aminés de l'année 1964 peuvent difficilement être comparés entre eux car les modes de récolte et de dessiccation des feuilles du *Vinca media*, que nous ne cultivions pas à cette époque, ne furent pas les mêmes que ceux du *Vinca minor* et du *Vinca major*.

Toutefois, les résultats des mois de mai, pour les trois Pervenches, montrent l'importance quantitative de l'alanine, de l'acide γ aminobutyrique, et des amides.

D'autre part, le tableau II, montrant 2 séries de dosages réalisées sur le même prélèvement (et bien que ces dosages soient en nombre restreint), indique que nos méthodes d'extraction et de dosage sont reproductibles.

Dosages des acides aminés au cours de l'année 1965 :

1. Acides aminés du *Vinca major* (1965) :

Le tableau IV donne, par ordre d'importance moyenne décroissante, en micromoles pour 100 g de poids sec, les acides aminés dosés dans les feuilles du *Vinca major*, récoltées à 9 H et à 19 H en février, avril et juin 1965.

T A B L E A U I

VINCA MINOR (Feuilles)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC

ACIDES AMINES	M A R S 1 9 6 4 (19h)	M A I 1 9 6 4 (19h)
Alanine	1049,46	466,53
Ac.γaminobutyrique	718,15	599,83
Asparagine (+glutamine)	624,04	544,29
Proline	0,10	traces
Tyrosine	54,96	283,25
Sérine	147,40	199,94
Valine	105,48	72,20
Thréonine	86,33	236,04
Leucine	85,50	44,43
Lysine	70,92	66,64
Isoleucine	77,86	52,76
Ac. glutamique	179,85	72,20
Ac. aspartique	88,27	119,41
Arginine	0	105,52
Phénylalanine	0,01	36,10
Glycine	114,09	58,31
Histidine	non mesurable	traces
Ornithine	traces	0
Méthionine	0	traces
Ac.αaminoadipique	traces faibles	0
Tryptophane	0	0
Ac.βaminoisobutyrique	non mesuré	non mesuré
β alanine	non mesuré	non mesuré
Glucosamine	traces	quantité importante plus que isoleucine
X? avant ac. asp.	quantité importante	quantité mesurable
X? entre thr et sér. (uniquement à 30°C)	quantité mesurable	quantité mesurable
X? juste avant Gly. (uniquement à 50° C)	0	0

T A B L E A U II

VINCA MAJOR (Feuilles)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC

ACIDES AMINES	M A I 1 9 6 4 (19h)	M A I 1 9 6 4 (19h)
Alanine	2455,70	
Ac. γaminobutyrique	2884,74	2897,24
Asparagine (+glutamine)	2538,45	2547,34
Proline	2507,63	
Tyrosine	293,52	
Sérine	424,60	429,60
Valine	634,82	
Thréonine	544,84	
Leucine	345,73	
Lysine	213,27	
Isoleucine	334,07	
Ac. glutamique	619,82	
Ac. aspartique	723,40	
Arginine	104,41	
Phénylalanine	80,53	
Glycine	199,66	
Histidine	86,64	
Ornithine	traces	traces
Méthionine	traces	
Ac. αaminoadipique	0	
Tryptophane	0	
Ac. βaminoisobutyrique	traces	
βalanine	quantité mesurable	
Glucosamine	traces	
X? avant ac. asp.	quantité importante	
X? entre thr et sér. (uniquement à 30° C)	quantité assez importante	
X? juste avant Gly. (uniquement à 50°C)	quantité assez importante	

T A B L E A U III

VINCA MEDIA (Feuilles)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC.

ACIDES AMINES	M A I 1 9 6 4
Alanine	307,96
Ac. α aminoisobutyrique	407,66
Asparagine (+glutamine)	2788,94
Proline	3596,49
Tyrosine	traces
Sérine	107,18
Valine	96,36
Thréonine	222,43
Leucine	19,43
Lysine	36,10
Isoleucine	27,77
Ac. glutamique	55,81
Ac. aspartique	160,78
Arginine	traces
Phénylalanine	33,32
Glycine	108,30
Histidine	47,10
Ornithine	traces
Méthionine	0
Ac. α aminoadipique	0
Tryptophane	traces
Ac. β aminoisobutyrique	non mesuré
β alanine	non mesuré
Glucosamine	quantité mesurable (de l'ordre de la leucine)
X? avant ac. asp.	quantité mesurable assez importante
X? entre thr et sér. (uniquement à 30°C)	quantité mesurable
X? juste avant Gly. (uniquement à 50°C)	traces

- Parmi les 12 acides aminés principaux trouvés au cours de ces mois, le matin et le soir, se---- trouvent toujours les 9 acides suivants :

D'abord l'alanine en très grande quantité,-- puis l'acide γ aminobutyrique et les amides (asparagine + glutamine) en grande quantité, puis en moins---- grande quantité et par ordre d'importance décroissante la thréonine, la valine, la sérine, la leucine, l'isoleucine, et l'acide aspartique.

Nous avons trouvé ces 9 acides aminés parmi les 12 premiers en mai 1964, mais la comparaison ne-- peut aller plus loin. *En effet, seuls les pourcentages sont comparables d'une année à l'autre, les quantités réelles des acides aminés variant selon l'en--- soleillement, la nébulosité, la pluviosité, et la température moyenne de ces années.*

- Les taux des variations diurnes, de 9 H à- 19 H, des acides aminés des feuilles du *Vinca major*-- au cours des mois de février, avril et juin 1965, sont représentés par le tableau V.

De ce tableau, il ressort un fait très net,-- la diminution diurne de l'acide aspartique, diminution qui décroit de février à juin, tout en gardant le plus fort pourcentage de diminution dans chaque mois.

L'acide glutamique présente une variation sous forme de courbe de GAUSS ; il décroit en février et--- juin, mais augmente en avril.

Remarquons également que la moyenne des aug-- mentations diurnes est assez forte en février, nettement moins importante en avril, et relativement faible en juin.

- D'autre part, que ce soit à 9 H ou à 19 H, chaque acide est en général moins important en février qu'en juin et passe par un maximum en avril.

C'est ce que nous pouvons voir sur le ta---- bleau VI qui indique les taux de variations des acides aminés des feuilles du *Vinca major* par rapport au mois de février 1965.

Ce tableau montre immédiatement que l'acide-glutamique est l'acide aminé qui augmente le moins en-avril à 9 H et 19 H, et qu'il diminue même en juin par rapport aux valeurs de février.

Notons également que à 9 H et 19 H en avril, ce sont les amides qui augmentent le plus, et que c'est l'acide glutamique qui augmente le moins, tandis qu'en juin, ce sont la leucine et la thréonine qui augmentent le plus, et que c'est encore l'acide glutamique qui aug mente le moins.

2. ACIDES AMINES DU *VINCA MINOR* (1965) :

En ce qui concerne les feuilles du *Vinca minor*, récoltées à 9 H et à 19 H, en février, avril et-- juin 1965, les résultats des dosages des acides aminés apparaissent, par ordre d'importance moyenne décrois-- sante, en micromoles pour 100 g de poids sec, dans le-tableau VII.

- Ce tableau indique que parmi les 12 acides aminés principaux trouvés au cours de ces mois, que ce soit à la récolte réalisée à 9 H ou à 19 H, se trouvent toujours les 10 acides aminés suivants :

D'abord, l'alanine, l'acide γ aminobutyrique, et les amides (asparagine + glutamine) dominent large-- ment comme chez le *Vinca major*.

T A B L E A U IV

VINCA MAJOR (FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés pour 100 g de poids sec.

ACIDES AMINES	FEVRIER 1965		AVRIL 1965		JUIN 1965	
	(9 h)	(19 h)	(9 h)	(19 h)	(9 h)	(19 h)
Ala	506,34	1503,48	3385,44	4775,88	2269,36	2196,61
γ	401,00	923,71	3439,31	3269,36	1233,82	1377,39
Asp. (+ glut)	204,45	418,90	3377,39	3561,22	549,40	437,38
Pro.	185,02	traces	366,00	537,90	traces	traces
Tyr.	48,02	131,58	345,74	264,09	59,59	79,42
Sér.	90,50	125,20	785,61	1096,08	18,05	234,10
Val.	81,34	117,42	445,71	851,70	204,39	222,99
Thr.	64,54	124,50	519,02	754,51	342,13	338,79
Leu.	46,08	110,48	596,50	853,09	254,37	288,81
Lys.	33,17	112,15	478,48	791,17	195,78	224,86
Isoleu.	49,00	75,23	294,36	560,40	170,78	159,12
Ac. glu.	166,70	132,11	211,05	266,87	74,14	54,71
Ac. asp.	128,67	49,69	587,90	360,18	154,96	113,02
Arg.	traces	52,05	259,93	390,17	104,14	112,47
Phé.	traces	66,62	Artefact	161,06	traces	traces
Gly.	36,09	85,50	248,37	218,27	68,87	121,08
Hist.	traces	7,35	Artefact	43,04	0	0
Orn.	traces	traces	32,50	25,37	traces	traces
Méth.	traces	0	16,66	traces	traces	traces
α	0	0	0	traces	0	0
Trypt.	0	traces	$\neq$ 15,00	$\neq$ 25,00	0	0
β	0	0	traces	traces	0	0
β ala.	0	0	traces	$\neq$ 40,00	traces	0
Glucosamine	traces	mesurable	mesurable	mesurable	traces	traces
X? avant ac. asp.	important	important	important	important	important	important
X? entre thr et sér à 30° C	0	mesurable	important	important	mesurable	mesurable
X? juste avant Gly. à 50° C	traces	traces	0	0	0	0

TABLEAU V

VINCA MAJOR

% d'augmentation et de diminution de 9 H à 19 H

FEVRIER		AVRIL		JUIN	
Lys.	+ 259 %	Val.	+ 91 %	Sér.	+ 1200 %
Ala.	+ 197 %	Isoleu.	+ 90 %	Gly.	+ 76 %
Tyr.	+ 172 %	Lys.	+ 65 %	Tyr.	+ 34 %
Leu.	+ 139 %	Arg.	+ 50 %	Lys.	+ 14 %
Gly.	+ 136 %	Pro.	+ 46 %	Leu.	+ 13 %
ɣ	+ 130 %	Thr.	+ 45 %	ɣ	+ 11 %
Asp. (+ glu.)	+ 95 %	Leu.	+ 43 %	Val.	+ 9 %
Thr.	+ 93 %	Sér.	+ 39 %	Arg.	+ 8 %
Isoleu.	+ 53 %	Ala.	+ 38 %	Thr.	- 1 %
Val.	+ 44 %	Ac. glu.	+ 26 %	Ala.	- 3 %
Sér.	+ 38 %	Asp. (+ glu.)	+ 5 %	Isoleu.	- 6 %
Arg.	non mesurable +	ɣ	- 4 %	Asp. (+ glu.)	- 19 %
Ac. glu.	- 19 %	Gly.	- 12 %	Ac. glu.	- 25 %
Ac. asp.	- 61 %	Ornithine	- 21 %	Ac. asp.	- 33 %
Pro.	non mesurable -	Tyr.	- 23 %		
		Ac. asp.	- 38 %		

T A B L E A U VI

VINCA MAJOR

% d'augmentation et de diminution par rapport à Février 1965

AVRIL 9 H		JUIN 9 H		AVRIL I9 H		JUIN I9 H	
Asp. (+ glu.)	+ I555%	Lys.	+ 490%	Sér.	+ 776%	Thr.	+ I72%
Lys.	+ I348%	Leu.	+ 452%	Asp. (+ glu.)	+ 751%	Leu.	+ I6I%
Leu.	+ II95%	Thr.	+ 434%	Leu.	+ 675%	Ac.asp.	+ I30%
Sér.	+ 772%	Ala.	+ 348%	Arg.	+ 650%	Arg.	+ II5%
Y	+ 757%	Isoleu.	+ 246%	Isoleu.	+ 646%	Isoleu.	+ II2%
Thr.	+ 7I2%	Y	+ 207%	Ac.asp.	+ 634%	Lys.	+ I00%
Tyr.	+ 6I8%	Asp. (+ glu.)	+ I67%	Lys.	+ 606%	Val.	+ 89%
Gly.	+ 59I%	Val.	+ I5I%	Hist.	+ 5I4%	Sér.	+ 87%
Ala.	+ 568%	Gly.	+ 88%	Thr.	+ 508%	Y	+ 49%
Isoleu.	+ 500%	Tyr.	+ 20%	Val.	+ 280%	Ala.	+ 46%
Val.	+ 449%	Ac.asp.	+ 20%	Y	+ 254%	Gly.	+ 42%
Ac.asp.	+ 358%	Ac.glu.	- 54%	Ala.	+ 2I7%	Asp. (+ glu.)	+ 4%
Pro.	+ 97%	Sér.	- 80%	Gly.	+ I56%	Tyr.	- 39%
Ac.glu.	+ 27%			Phé.	+ 143%	Ac.glu.	- 59%
				Tyr.	+ I0I%		
				Ac.glu.	+ I00%		

Ensuite, nous trouvons la sérine, puis en--- moins grande quantité et selon un ordre décroissant,- la valine, la leucine, la thréonine, la lysine, l'arginine, et l'isoleucine.

Contrairement au *Vinca major*, on ne trouve-- pas l'acide aspartique dans cette liste des principaux acides aminés, mais on trouve par contre l'arginine-- et la proline.

(Nous avons trouvé, en mars et en mai 1964,- la plupart de ces acides aminés parmi les 12 acides-- les plus importants quantitativement).

- Le taux des variations diurnes, de 9 H à-- 19 H, des acides aminés des feuilles du *Vinca minor*-- au cours des mois de février, avril et juin 1965, sont représentés par le tableau VIII.

De ce tableau, il ressort un fait très net,- constant, et inattendu, la diminution du taux d'acide glutamique, de 9 H à 19 H, au cours des mois de fé--- vrier, avril et juin ; de plus, l'acide aspartique su bit une variation en courbe de GAUSS analogue à celle de l'acide glutamique chez le *Vinca major*, si bien--- que les variations de ces deux acides semblent inversées chez le *Vinca minor* et chez le *Vinca major*.

La majorité des acides présentent une varia-- tion maximale en avril, contrairement au *Vinca major*- où les variations maximales se situaient en février. *L'explication de ce fait réside peut-être dans les--- différences écologiques des stations. L'ensoleille--- ment du Vinca major contrastant très nettement avec-- l'aspect très ombragé de la station du Vinca minor.*

La tyrosine subit une variation inverse de--- celle que l'on constate chez le *Vinca major*, c'est-à- dire que le mois d'avril correspond à la quantité maximale de tyrosine chez le *Vinca minor* et à la quanti té minimale chez le *Vinca major*.

- D'autre part, que ce soit à 9 H ou à 19 H, chaque acide est en général plus important en juin-- qu'en février, et passe par un maximum en avril.

C'est ce que nous pouvons voir sur le tableau IX qui indique les taux de variations des acides aminés des feuilles du *Vinca minor* par rapport au mois de février 1965.

Ce tableau montre immédiatement, comme dans le cas du Vinca major, que l'acide glutamique est celui qui non seulement augmente le moins mais diminue le plus en avril et juin, à 9 H et à 19 H, par rapport aux valeurs de février.

Notons également que à 9 H et 19 H en avril, c'est la lysine qui augmente le plus, et que ce sont l'histidine et la phénylalalanine qui augmentent le moins, tandis qu'en juin, ce sont les amides qui augmentent le plus, et que ce sont l'alanine et la phénylalanine qui augmentent le moins.

Dosages des acides aminés au cours de l'année 1966 :

1. Acides aminés du *Vinca major* (1966) :

Le tableau X donne, par ordre d'importance-- moyenne décroissante, en micromoles pour 100 g de--- poids sec, les acides aminés dosés dans les feuilles du *Vinca major*, récoltées à 19 H en mars, avril, mai juin, juillet et septembre 1966.

Parmi les 12 acides aminés principaux trouvés au cours de ces mois, se trouvent dans la majorité--- des cas, les 9 acides aminés suivants : l'alanine,---

l'acide γ aminobutyrique, les amides (asparagine + glutamine), la proline, l'acide glutamique, la sérine, la valine, la tyrosine et la thréonine.

Ces résultats confirment la prédominance-- de l'alanine, de l'acide γ aminobutyrique et des-- amides, révélée par les dosages de 1964 et de 1965.

L'importance quantitative des autres acides pouvant varier d'une certaine manière selon les années ou les mois, nous retrouverons toujours les-- mêmes acides parmi les premiers mais l'ordre peut-changer ; c'est ainsi que la leucine, l'isoleucine et l'acide aspartique ne sont plus parmi les 9 premiers en 1966, la tyrosine et surtout la proline-- et l'acide glutamique ayant pris leur place.

La proline, très peu importante en 1965,-- apparaît en mars et avril 66 en aussi grande quantité qu'en mai 64 ; l'acide glutamique, également-- en faible quantité (par rapport aux autres acides) en 1965 sauf en février, apparaît aussi parmi les plus importants en mars et en avril 66, et en mai 64.

En fait, le tableau X montre très nette-- ment que la concentration maximale doit se situer chez les feuilles extrêmement jeunes au moment de l'apparaition des fleurs (stade atteint en mars-- 66).

Quelques acides ont cependant leur quantité maximale en avril 66, au moment de la pleine-- floraison, alors que les feuilles sont encore jeunes et de couleur vert clair ; ce sont les amides (asparagine + glutamine) la valine, la sérine,--- l'acide aspartique, l'acide glutamique, la phényl alanine et l'histidine.

T A B L E A U VII

VINCA MINOR (FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés pour 100 g de poids sec.

ACIDES AMINES	FEVRIER 1965		AVRIL 1965		JUIN 1965	
	(9 h)	(19 h)	(9 h)	(19 h)	(9 h)	(19 h)
Ala.	1034,88	1618,40	1421,82	1474,53	1438,48	1041,37
γ	1161,30	1430,33	1588,44	2174,39	1271,66	1630,09
Asp. (+ glu.)	517,44	902,20	485,97	2196,60	3726,73	3973,88
Pro.	traces	184,60	traces	211,05	585,94	174,95
Tyr.	66,15	69,40	86,08	199,94	138,85	99,97
Sér.	327,81	434,44	633,15	1074,69	399,88	474,86
Val.	104,22	166,56	219,38	499,86	261,03	174,95
Thr.	214,62	144,35	358,23	313,80	444,32	163,84
Leu.	101,43	158,23	294,36	491,52	222,16	152,73
Lys.	77,91	134,63	238,82	452,65	227,71	163,84
Isoleu.	74,97	113,81	138,85	361,01	188,83	152,73
Ac. glu.	244,02	101,32	66,64	55,54	63,87	traces
Ac. asp.	70,56	40,25	63,87	124,96	152,73	136,07
Arg.	79,38	120,75	202,72	352,67	199,94	113,85
Phé.	63,21	91,60	61,09	149,95	99,97	66,64
Gly.	54,39	102,71	147,18	158,28	144,40	74,97
Hist.	35,28	16,65	36,10	24,99	80,53	19,43
Orn.	0	6,24	traces	traces	0	0
Méth.	2,79	8,32	27,77	16,66	13,88	0
α	0	0	0	traces	0	0
Trypt.	traces	traces	traces	0	traces	0
β	non mesuré	0	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré
β Ala.	non mesuré	traces	non mesuré	non mesuré	non mesuré	non mesuré
Glucosamine	important	important	important	important	important	important
X? avant ac. asp.	important	important	important	important	important	important
X? entre thr. et sér. (à 30°C)	important	important	important	important	important	important
X? juste avant Gly. (à 50°C)	0	0	0	0	0	0

T A B L E A U V I I I

VINCA MINOR

% d'augmentation et de diminution de 9 H à 19 H

FEVRIER		AVRIL		JUIN	
Gly.	+ 88%	Asp. (+ glu.)	+ 352%	?	+ 28%
Lys.	+ 74%	Isoleu.	+ 361%	Sér.	+ 18%
Asp. (+ glu.)	+ 74%	Phé.	+ 144%	Asp. (+ glu.)	+ 6%
Val.	+ 59%	Tyr.	+ 131%	Ac. asp.	- 10%
Leu.	+ 56%	Val.	+ 127%	Gly.	- 19%
Ala.	+ 56%	Ac. asp.	+ 96%	Isoleu.	- 19%
Isoleu.	+ 52%	Lys.	+ 89%	Ala.	- 27%
Arg.	+ 51%	Arg.	+ 74%	Lys.	- 28%
Phé.	+ 44%	Sér.	+ 69%	Tyr.	- 28%
Sér.	+ 32%	Leu.	+ 67%	Leu.	- 31%
?	+ 23%	?	+ 36%	Phé.	- 33%
Tyr.	+ 4%	Gly.	+ 7%	Val.	- 33%
Pro.	importante non mesurable	Ala.	+ 3%	Arg.	- 43%
Thr.	- 32%	Pro.	importante non mesurable	Thr.	- 63%
Ac. asp.	- 42%	Thr.	- 12%	Pro.	- 70%
Hist.	- 54%	Ac. glu.	- 16%	Hist.	- 76%
Ac. glu.	- 58%	Hist.	- 33%	Ac. glu.	importante non mesurable

T A B L E A U IX

VINCA MINOR

% d'augmentation et de diminution par rapport à Février 1965.

AVRIL 9 H		JUIN 9 H		AVRIL 19 H		JUIN 19 H	
Lys.	+ 209%	Asp. (+ glu.)	+ 620%	Lys.	+ 237%	Asp. (+ glu.)	+ 340%
Leu.	+ 191%	Lys.	+ 194%	Isoleu.	+ 219%	Ac. asp.	+ 240%
Gly.	+ 172%	Gly.	+ 166%	Leu.	+ 210%	Tyr.	+ 43%
Arg.	+ 155%	Isoleu.	+ 154%	Ac. asp.	+ 210%	Isoleu.	+ 34%
Val.	+ 110%	Arg.	+ 151%	Val.	+ 200%	Lys.	+ 21%
Sér.	+ 93%	Val.	+ 150%	Arg.	+ 193%	Hist.	+ 18%
Isoleu.	+ 86%	Hist.	+ 128%	Tyr.	+ 188%	Thr.	+ 13%
Thr.	+ 67%	Leu.	+ 119%	Sér.	+ 147%	ɣ	+ 13%
Ala.	+ 37%	Ac.asp.	+ 117%	Asp (+ glu.)	+ 143%	Sér.	+ 9%
ɣ	+ 36%	Tyr.	+ 109%	Thr.	+ 117%	Val.	+ 4%
Tyr.	+ 30%	Thr.	+ 107%	Phé.	+ 63%	Leu.	- 3%
Hist.	+ 2%	Phé.	+ 57%	Gly.	+ 54%	Pro.	- 5%
Phé.	- 3%	Ala.	+ 39%	ɣ	+ 52%	Arg.	- 5%
Asp. (+ glu.)	- 6%	Sér.	+ 22%	Hist.	+ 50%	Gly.	- 27%
Ac.asp.	- 10%	ɣ	+ 9%	Pro.	+ 14%	Phé.	- 27%
Ac.glu.	- 72%	Ac.glu.	- 74%	Ala.	- 8%	Ala.	- 35%
				Ac.glu.	- 45%	Ac.glu.	importante non - mesurable

Il semble que l'on puisse dire que c'est au moment de la floraison (du début à la fin) que les feuilles (très jeunes) des plants correspondants--- possèdent la plus grande quantité d'acides aminés- soit, pour l'année 1966, du 15 mars au 15 avril.

En effet, dès que la floraison est terminée (mai 66), les quantités d'acides aminés diminuent-- énormément et arrivent à un niveau très faible en-- juin 66, mais la concentration de certains acides-- est cependant minimale en mai 66 et s'accroit de--- nouveau en juin ; ce sont les amides (asparagine + glutamine), l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'ornithine, l'histidine, la proline, et à un moindre degré, la phénylalanine, la glycine, l'arginine la sérine, et la thréonine.

2. Acides aminés du *Vinca minor* (1966) :

Le tableau XI donne, par ordre d'importance moyenne décroissante, en micromoles pour 100 g de-- poids sec, les acides aminés dosés dans les feuilles du *Vinca minor*, récoltées à 19 H en mars, avril, mai juin et juillet 1966.

Parmi les 12 acides aminés principaux trouvés au cours de ces mois, se trouvent, dans la majorité des cas, les 8 acides aminés suivants : l'alanine, l'acide γ aminobutyrique, les amides (asparagine + glutamine); la proline, la tyrosine, la va-- line, la sérine, et la thréonine.

Nous constatons, comme dans le cas du Vinca major, que l'alanine, l'acide γ aminobutyrique, et- les amides (asparagine + glutamine), sont les aci-- des les plus importants en 1964, 65, et 66.

T A B L E A U X

VINCA MAJOR (FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés pour 100 g de poids sec.

ACIDES AMINES	Mars 66 19 H	Avr. 66 19 H	Mai 66 19 H	Juin 66 19 H	Juil6666 19 H	Sept. 66 19 H
Ala.	3559,56	I552,90	1058,87	620,10	766,45	669,25
Y	2780,33	2042,20	559,84	337,12	758,12	5I3,74
Asp. (Glu.)	2588,44	42I2,98	116,63	206,05	I5I9,12	277,70
Pro.	I547,62	998,33	traces	114,69	4609,82	297,13
Tyr.	653,70	583,17	249,65	117,73	152,73	34I,57
Sér.	7I3,68	872,25	I02,47	II4,69	2I6,60	I22,18
Val.	705,36	832,54	I07,19	74,98	294,86	61,09
Thr.	6I2,6I	404,88	I04,13	I05,52	374,89	86,08
Leu.	5I4,58	290,75	59,43	32,49	77,75	22,21
Lys.	480,70	26I,59	98,58	84,42	97,19	69,42
Isoleu.	427,93	400,89	54,15	35,54	I08,30	36,10
Ac. Glu.	752,57	9I6,I3	80,53	I49,96	72,20	I05,52
Ac. asp.	466,26	624,27	34,15	83,31	386,00	2II,05
Arg.	2I0,22	I52,18	traces	13	55,54	27,77
Phé.	87,20	I42,18	36,37	39,43	22,21	4I,65
Gly.	I78,00	I38,29	5I,37	6I,93	161,06	52,76
Hist.	66,09	I2I,08	traces	13,05	55,54	8,33
Orn.	36,93	27,49	traces	22,49	traces	traces
Méth.	0	traces	0	0	traces	0
α	présence	traces	0	0	0	0
Trypt.	traces	traces	traces	traces	0	0
β	0	0	0	0	0	0
β Ala.	présence	présence	traces	traces	traces	0
Glucosamine	présence	présence	présence	présence	présence	traces
X? av. ac. asp.	présence	présence	présence	présence	présence	présence
X? entre thr. et sér. (à 30°C)	présence	présence	présence	présence	0	0
X? juste av. Gly. (à 50°C)	présence	présence	0	0	présence	0

T A B L E A U XI

VINCA MINOR (FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés pour 100 g de poids sec.

ACIDES AMINES	Mars 66 19 H	Avr. 66 19 H	Mai 66 19 H	Juin 66 19 H	Juil. 66 19 H
Ala.	567,34	1017,71	745,07	396,55	424,88
ϒ	1335,74	2007,77	2019,71	864,48	769,22
Asp. (+ glu.)	291,39	1202,44	3601,76	910,02	913,63
Prol.	664,54	559,56	1461,81	628,71	963,61
Tyr.	339,07	591,22	513,19	210,77	74,57
Sér.	261,04	738,68	1077,47	180,22	199,94
Val.	266,04	612,88	1115,52	110,80	49,98
Thr.	227,99	427,10	412,66	195,22	116,63
Leu.	87,47	350,46	466,53	46,65	22,21
Lys.	58,04	232,16	217,72	99,97	77,75
Isoleu.	128,29	372,39	612,88	52,76	27,77
Ac. glu.	74,70	107,74	123,57	63,04	61,09
Ac. asp.	122,19	211,61	409,88	135,79	233,26
Arg.	traces	410,99	271,87	traces	61,09
Phé.	51,37	162,17	301,88	21,10	13,88
Gly.	59,98	92,75	121,35	88,31	77,75
Hist.	traces	39,99	62,48	14,44	13,88
Orn.	traces	5,55	traces	26,38	24,99
Méth.	0	0	0	0	0
α	0	présence	présence	0	0
Trypt.	0	0	0	0	traces
β	0	0	0	traces	0
β Ala.	0	traces	présence	traces	0
Glucosamine	présence	présence	présence	présence	présence
X? av. ac. asp.	présence	présence	présence	présence	présence
X? entre thr. et sér. (à 50°C)	présence	présence	0	présence	0
X? juste av. gly. (à 50°C)	0	présence	traces	0	0

Par contre, nous ne retrouvons pas en 66,--- l'importance quantitative moyenne de la leucine, de- l'isoleucine, de la lysine et de l'arginine, tandis- que la tyrosine, et la sérine apparaissent en quanti té importante au cours de chacun de ces 4 mois, de-- même que la proline (ce qui était également le cas-- en 1965, à 19 H, mais non en 1964).

Nous voyons donc que, les 3 acides les plus- importants d'une manière constante mis à part, 10--- autres acides aminés ont une importance relative va- riable au cours des mois et des années, et une dou-- zaine d'autres acides sont en faible quantité ou mê- me à l'état de traces.

La quantité maximale d'acides aminés,--- est atteinte en avril-mai pour le Vinca minor, alors qu'elle l'était en mars-avril pour le Vinca major ; ceci vient peut-être du fait que la station du Vinca major est très ensoleillée et que les plants de cette station ont eux-mêmes fleuri en mars-avril 66, tandis que les plants du *Vinca minor* n'ont eu aucune fleur.

(Sur le tableau XI, *l'époque* de floraison est mentionnée, mais ces exemplaires n'ont pas eux-mêmes fleuri).

Quoiqu'il en soit, le tableau XI indique que l'importance quantitative des acides aminés est très faible en juin 66, de même qu'elle l'était en juin-- 65, soit après la fin de "l'époque" de la floraison- et que les divers acides aminés évoluent les uns par rapport aux autres au cours de ces mois, d'une ma--- nière analogue à celle de l'année 1965.

L'ensemble des tableaux précédents peut être ainsi résumé :

- *Les acides aminés les plus importants pour février, avril et juin 1965, à 9H et à 19 H, ainsi-- que pour mars, avril, mai, juin, juillet et septem-- bre 1966 à 19 H, chez le Vinca minor et le Vinca ma- jor sont les 6 acides aminés suivants : alanine,----*

acide γ aminobutyrique, asparagine (+ glutamine), sérine, valine et thréonine.

(Ce sont également les acides les plus fréquemment cités pour de nombreuses plantes, en particulier l'alanine et l'acide γ aminobutyrique ; toutefois les acides glutamique et aspartique semblent souvent en plus grande quantité que leurs amides, en particulier chez le *Rauwolfia serpentina* (MADAN 1967) ce qui est loin d'être le cas ici). (En 1966, la proline et la tyrosine peuvent s'ajouter à cette liste, tandis qu'en 1965, ce sont la leucine, l'isoleucine et la lysine qui avaient une certaine importance relative.

- Les acides aminés les moins importants en 1965 et 1966 sont les suivants :

Histidine, ornithine, méthionine, acide γ aminoadipique (présence vérifiée à l'aide d'un témoin interne), et tryptophane, à l'état de traces ou même absent.

La cystine est toujours absente. (absence vérifiée par l'introduction d'un témoin interne).

En 1965, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont en proportion plus importante chez le *Vinca major* que chez le *Vinca minor*, tandis que c'est l'inverse pour l'arginine et la proline.

En ce qui concerne les variations diurnes des taux d'acides aminés, chez le *Vinca minor* et chez le *Vinca major*, le pourcentage d'acide aspartique, mais aussi d'acide glutamique (ce qui était beaucoup moins prévu), diminuent de 9 H à 19 H (à une exception près pour chaque acide).

Par ailleurs, les variations diurnes sont quelquefois inversées chez le *Vinca minor* et le *Vinca major*.

En ce qui concerne les variations des taux--- d'acides aminés par rapport au mois de février, chez- le *Vinca minor* et chez le *Vinca major*, ce sont les--- pourcentages d'acide glutamique qui augmentent le --- moins, et même surtout diminuent le plus, que ce soit 9 H ou à 19 H, (ce fait a été trouvé également chez-- le Tabac par NOGUCHI, YAMAMOTO et TAMAKI (NOGUCHI---- 1964).

Après cet acide, et seulement à 19 H, ce sont les taux d'alanine et de glycine qui augmentent le--- moins, tandis que ce sont ceux d'acide aspartique et- d'isoleucine qui augmentent le plus.

Les autres variations sont plus diverses.

Ce résumé schématique étant fait, discutons-- les courbes suivantes obtenues d'après les tableaux-- IV, VII, X et XI.

(Ces courbes n'intéressent pas l'année 1964-- dont les prélèvements n'ont servi qu'à mettre nos --- techniques au point).

+ *Il faut d'abord savoir que, en 1965, la floraison eut lieu un mois plus tard qu'en 1966. La pleine floraison eut lieu en avril 1965 alors qu'elle était déjà apparue à la fin du mois de mars en 1966.*

Au cours de ces deux années, les plants du--- *Vinca major* ont eux-mêmes fleuri abondamment alors--- que les plants du *Vinca minor* sont restés à l'état végétatif ;

Les "époques" de floraison mentionnées à leur sujet ont été établies selon le comportement des individus d'une autre station, découverte ultérieurement- dans la même région. Cette dernière station est ac--- tuellement détruite mais nous avons pu récolter des-- boutons floraux et des fleurs à différents stades en-

1966, ce qui nous permettra d'établir des comparai--- sons avec les prélèvements analogues du *Vinca major*.

En 1965 et 1966, les feuilles prélevées en fé vrier sont des feuilles anciennes ayant passé l'hiver, les feuilles de mars sont de très jeunes feuilles d'un vert très clair, celles d'avril, sont jeunes mais déjà plus foncées, et celles de mai et des mois suivants ont l'aspect et la couleur foncée habituels.

- *Les courbes de 1965, à 9H et à 19 H, indi-- quent que l'anabolisme de la majorité des acides aminés libres est très nettement augmenté au début de la floraison et au moment de la pleine floraison, et que ce métabolisme subit une brusque chute dès que la flo raison est terminée.*

Ce fait est également signalé par HOFSTRA chez la Tomate (HOFSTRA 1964) et chez le *Papaver sommife-- rum* par KLYSHEV et KORDAKOV (KLYSHEV 1964).

Il semblerait, selon le cas du *Vinca minor*,-- qu'il ne soit pas nécessaire que les fleurs apparaissent vraiment pour que l'anabolisme des acides aminés libres soit sujet à des variations importantes à "l'époque" de la floraison.

- Ces courbes de 1965 peuvent s'expliquer par le fait que la phase lumineuse en février est trop--- courte pour que la synthèse soit importante entre 9 H et 19 H, tandis qu'elle est déjà trop longue, avant-- 9 H en juin, pour que la différence soit sensible --- entre les prélèvements de 9 H et de 19 H, l'excès de- l'acide libre se combinant sans doute ou se transformant avant la fin de la journée par des processus variés, par décarboxylation et par transamination entre autres, si bien que l'on observe même fréquemment une diminution de l'acide libre à 19 H par rapport à la-- valeur dosée à 9 H.

Par contre, en avril, les radiations lumineuses sont intenses mais uniquement au milieu de la journée, si bien que l'anabolisme photosynthétique est très différent selon les prélèvements et plus important à 19 H, à un degré plus ou moins grand selon les acides.

(Quelques fleurs furent visibles en février chez le *Vinca minor*. Ce fait expliquerait peut-être l'importance de la quantité d'alanine à cette époque par rapport à avril).

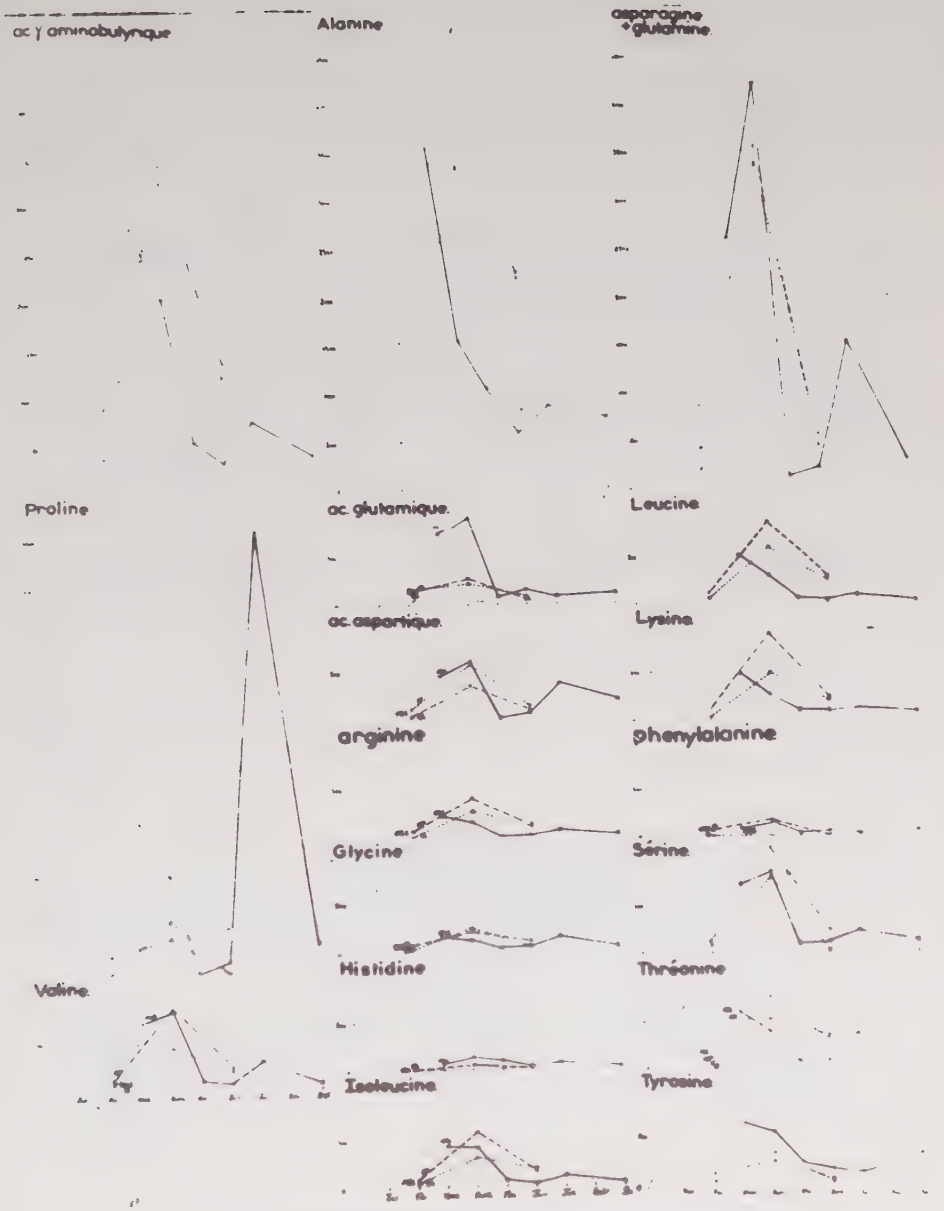
Cependant quelques courbes méritent une attention particulière ; la proline chez le Vinca major, l'acide aspartique, la thréonine et l'histine chez le Vinca minor, et surtout, l'acide glutamique chez les deux Pervenches subissent d'une manière plus ou moins nette, des modifications inverses.

On observe en effet les résultats d'un phénomène catabolique de 9 H à 19 H, il semblerait que l'acide libre en question se forme pendant la phase obscure et qu'il se combine ou se transforme très rapidement sous l'effet de la lumière.

C'est l'opinion également d'Andreeva qui prend comme exemple les feuilles de Tournesol, il note que dans ces feuilles, l'acide glutamique se forme à l'obscurité et diminue à la lumière, tandisque l'alanine déjà formée à l'obscurité, augmente à la lumière (Andreeva 1961 et 1960).

BASSHAM et KIRK indiquent au contraire que l'acide glutamique est le premier acide aminé formé par photosynthèse (BASSHAM 1964).

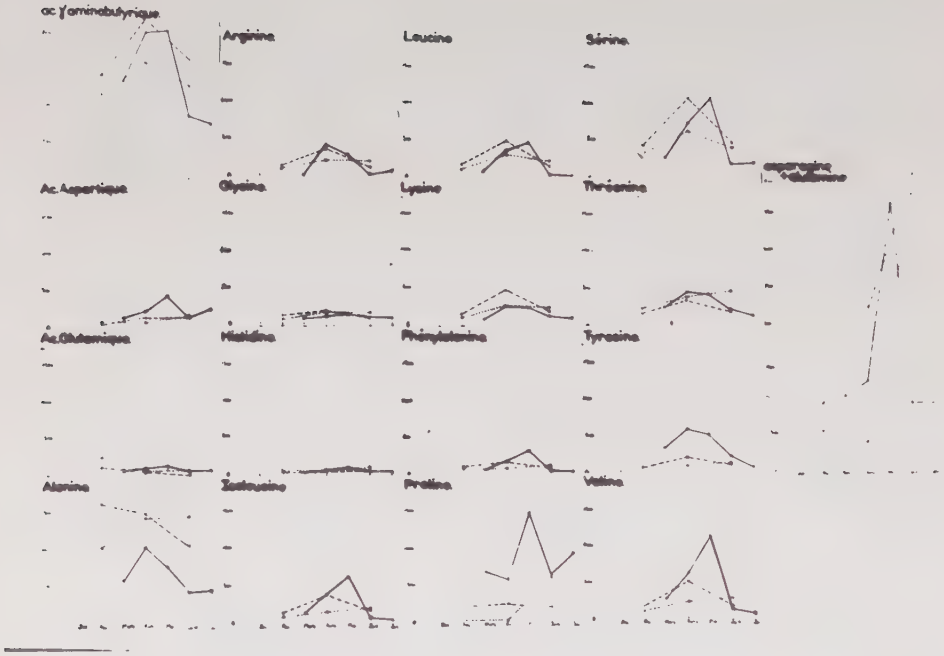
Quoiqu'il en soit, il semble bien selon RATNER et UKHINA que ces deux acides soient formés très rapidement et que leur azote soit réemployé dans un délai assez court pour la fabrication d'autres acides aminés (RATNER 1965).



Evolution de la teneur en acides aminés libres chez Vinca major L à divers stades de son développement.

En ordonnée : micromoles par 100g de poids sec
En abscisse : mois de l'année.
(mars-avril : floraison.
Juin-Juillet : fructification)

..... : Prélèvement de 1965 à 9h
- - - - : Prélèvement de 1965 à 19h
——— : Prélèvement de 1966 à 19h



Evolution de la teneur en acides aminés libres chez Vinca minor L.
à divers stades de son développement

En ordonnée : micromoles par 100g. de poids sec.
En abscisse : mois de l'année.
mars_avril : floraison.
juin_juillet : fructification.

..... Prélèvement de 1965 à 9h
- - - - Prélèvement de 1965 à 19h
——— Prélèvement de 1966 à 19h

Les courbes de 1966 s'expliquent dans la plu part des cas par un anabolisme des acides aminés libres accru au moment de la pleine floraison.

La chute est très rapide dès que la floraison est terminée. L'anabolisme passe par un minimum, généralement en juin, et reprend une importance, plus ou moins grande selon les cas, en juillet au moment de la maturation des fruits, avant de diminuer à nouveau en septembre. (Il s'agit ici de "l'époque" de la maturation des fruits car nous n'avons pu récolter en juin-juillet qu'une dizaine de fruits du *Vinca major* et aucun pour le *Vinca minor*).

Chez le *Vinca major*, la tyrosine a une recru descence seulement en septembre après la maturation des fruits ;

L'anabolisme de l'arginine et surtout de la Proline semblent importants en juillet, ce qui parait vraisemblable car ces acides sont des constituants importants des fruits et des graines (BOULTER 1963, YANKOV 1963).

Chez le Vinca minor le métabolisme de la proline semble encore plus particulier que chez le Vinca major ; son anabolisme est déjà important à "l'époque" de l'apparition des boutons floraux, puis cette synthèse subit un ralentissement au début de l'époque de la pleine floraison et augmente très nettement à l'époque de la maturation des fruits. VISHIN et RAZDAN ont indiqué ce fait chez l'Ephédra foliata (VISHIN 1962).

3. UTILISATION DE L'AUTOANALYSEUR TECHNICON.

DOSAGES DES DIFFERENTS ACIDES AMINES AU COURS DE LA VEGETATION DANS LES FEUILLES, LES FLEURS ET LES RACINES DU *VINCA MINOR*, du *VINCA MAJOR* et du *VINCA MEDIA* PENDANT LES ANNEES 1966 ET 1967.

Le tableau XII mentionne le nombre de micromoles d'acides aminés obtenues pour 100 g de poids sec après deux extractions et deux dosages différents réalisés sur une même poudre.

Si l'on excepte les quantités très importantes d'acide γ amino-butyrique et de proline (où l'erreur de dosage est énormèment multipliée par le calcul) la comparaison des valeurs obtenues indique que nos méthodes d'extraction et de dosage sont reproductibles.

Nous avons dosé des prélèvements de feuilles du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media*, effectués en 1966 et 1967, et quelques prélèvements de racines effectués en 1967. Tous ces prélèvements ayant été réalisés vers le quinzième jour de chaque mois, à 19 H ou à la tombée de la nuit en hiver.

Comme il a été indiqué précédemment, seules les extrémités des tiges et des racines ont été récoltées ainsi que les feuilles situées sur les quinze ou vingt centimètres supérieurs des tiges dressées.

Les résultats, compte tenu de la restriction précédemment exposées concernant l'asparagine, mais sur tout la glutamine, sont représentés sur les courbes et les tableaux suivants.

Dosages des acides aminés des feuilles au cours de l'année 1966 :

. Acides aminés du *Vinca media* (1966) :

Le tableau XIII indique les résultats, en micromoles pour 100 g de poids sec, des dosages des acides aminés dans les feuilles du *Vinca media* récoltées à 19 H au cours de l'année 1966 (de mars à décembre).

Quatre acides aminés se trouvent en très grande quantité ; ce sont, par ordre d'importance décroissante : l'acide γ amino butyrique, l'alanine, la proline, et l'asparagine (mélangée à la sérine), et cinq acides aminés en quantité relativement importante : l'acide glutamique, la valine, la glutamine, la tyrosine et l'acide aspartique.

Dosages des acides aminés des feuilles au cours des années 1966 et 1967 :

1. Acides aminés du *Vinca major* (1966-1967) :

Le tableau XIV indique les résultats, en micro moles pour 100 g de poids sec, des dosages des acides-aminés dans les feuilles du *Vinca major* récoltées à--- 19 H au cours des quatre derniers mois de l'année 1966 et au cours de l'année 1967 (de janvier à décembre).

T A B L E A U X I I

VINCA MINOR (FEUILLES - MAI 1966)

Micromoles d'acides aminés pour 100 g de poids sec.

ACIDES AMINES	Extraction et Dosage du 1er Février 68	Extraction et Dosage du 6 Février 68
Acide γ amino butyrique	1612,50	1987,50
Proline	1256,25	1868,75
Asparagine (+ sérine)	750	1012,50
Alanine	993,75	862,50
Valine	575	675
Tyrosine	506,25	418,75
Glutamine	193,75	0 (cf Asp.)
Leucine	281,25	275
Isoleucine	175	206,25
Lysine	181,25	175
Ac. aspartique	156,25	156,25
Histidine	156,25	143,75
Arginine	118,75	143,75
Ac. glutamique	127,50	131,25
Thréonine	118,75	131,25

Quatre acides aminés se trouvent en très grande quantité : ce sont par odre d'importance décroissante : la proline, l'alanine, l'acide γ amino butyrique et l'asparagine (mélangée à la sérine), et cinq acides aminés en quantité relativement importante : l'acide glutamique, la glutamine, la tyrosine, la valine et l'acide aspartique.

2. Acides aminés du *Vinca media* (1967) :

Le tableau XV indique les résultats, en micro moles pour 100 g de poids sec, des dosages des acides aminés dans les feuilles du *Vinca media* récoltées à 19 H au cours de l'année 1967 (de février à décembre).

Cinq acides aminés se trouvent en très grande quantité : ce sont, par ordre d'importance décroissante : l'asparagine (mélangée à la sérine), l'acide γ amino butyrique, l'alanine, la proline et la glutamine, et quatre acides aminés en quantité relativement importante : l'acide aspartique, la valine, la lysine et la leucine.

3. Acides aminés du *Vinca minor* (1966-1967) :

Le tableau XVI indique les résultats, en micro moles pour 100 g de poids sec, des dosages des acides aminés dans les feuilles du *Vinca minor* récoltées à 19 H au cours des quatre derniers mois de l'année 1966 et au cours de l'année 1967 (de janvier à décembre).

Les acides aminés se trouvant en plus grande quantité sont, par odre d'importance décroissante : l'asparagine (mélangée à la sérine), la proline et l'acide γ amino butyrique, puis l'alanine et l'acide glutamique. La valine, puis la glutamine, l'arginine, et la tyrosine présentent ensuite une certaine importance.

- L'ensemble de ces tableaux montre l'importance quantitative primordiale, pour les trois Pervenches, des

TABLEAU XIII

VINCA MEDIA (FEUILLES)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC.

ACIDES AMINES	Mars 66 19 H	Mai 66 19 H	Juin 66 19 H	Juil. 66 19 H	Sept. 66 19 H	Oct. 66 19 H	Nov. 66 19 H	Déc. 66 19 H
Ala.	4537,50	1218,75	1881,25	1225	500	2306,25	1618,75	906,25
ϒ	4887,50	718,75	1931,25	675	331,25	2525	1212,50	800
Asp. + Sér.	3025	468,75	943,75	481,25	1056,25	1587,50	725	693,75
Pro.	700	1431,25	1625	1087,50	4012,50	750	262,50	100
Tyr.	362,50	143,75	462,50	243,75	387,50	1025	843,75	481,25
Glu.	1100	0	0	0	81,25	525	112,50	traces
Val.	1312,50	412,50	1006,25	500	550	812,50	381,25	306,25
Thr.	625	143,75	268,75	175	237,50	406,25	112,50	193,75
Leu.	700	106,25	225	112,50	93,75	225	106,25	81,25
Lys.	750	181,25	231,25	181,25	218,75	562,50	293,75	262,50
Isoleu.	512,50	112,50	318,75	143,75	150	281,25	118,75	106,25
Ac. Glu.	412,50	893,75	1118,75	806,25	575	2100	1468,75	1250
Ac. Asp.	612,50	512,50	675	431,25	237,50	643,75	325	443,75
Arg.	412,50	50	118,75	présence	75	156,25	100	68,75
Phé.	187,50	68,75	150	106,25	137,50	250	143,75	200
Gly.	350	62,50	143,75	75	18,75	50	50	50
Hist.	325	81,25	143,75	81,25	112,50	137,50	87,50	93,75
Cyst.		traces						
Méth.					25	18,75	6,25	12,50
1-Méthyl-hist.	présence	présence	présence	présence				
Ethanolamine	traces		présence	présence				
X après leu.		présence	présence		présence	présence		
X avant ala.	présence		présence					
X avant lys.	présence	présence	présence	présence	présence	présence		présence

VINCA MAJOR (FEUILLES)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC.

ACIDES AMINES	Sept. 66 19 H	Oct. 66 19 H	Nov. 66 19 H	Déc. 66 19 H	Janv. 67 19 H	Févr. 67 19 H	Mars 67 19 H	Avr. 67 19 H	Mai 67 19 H	Juin 67 19 H	Juil. 67 19 H	Août 67 19 H	Sept. 67 19 H	Oct. 67 19 H	Nov. 67 19 H	Déc. 67 19 H
Ala.	1043,75	725	231,25	556,25	618,75	1693,75	2187,50	4812,25	4812,50	912,50	1350	550	793,75	793,75	862,50	1456,25
ɣ	700	775	806,25	787,50	1200	2493,75	4475	1850	1906,25	550	587,50	506,25	656,25	873,60	556,25	950
Asp. + Sér.	268,75	331,25	175	187,50	300	2937,50	3331,25	500	387,50	200	18,75	2652,50	387,50	556,25	406,25	500
Pro.	350	431,25	212,50	0	206,25	1031,25	1193,75	756,25	937,50	875	531,25	5431,25	162,50	200	traces	250
Tyr.	393,75	400	312,50	150	175	243,75	818,75	912,50	1462,50	312	593,75	231,25	306,25	368,75	143,75	231,25
Glu.	25	traces	0	125	62,50	368,75	1500	206,25	traces	traces	187,50	présence	0	0	0	traces
Val.	181,25	318,75	212,50	106,25	487,50	1287,50	1406,25	887,50	981,25	362,50	343,75	793,75	300	406,25	175	375
Thr.	106,25	156,25	93,75	12,50	206,25	231,25	662,50	350	237,50	68,75	112,50	présence	168,75	337,50	150	87,50
Leu.	37,50	50	37,50	37,50	118,75	262,50	718,75	525	431,25	81,25	81,25	137,50	93,75	106,25	75	137,50
Lys.	143,75	93,75	118,75	112,50	225	356,25	618,75	568,75	475	131,25	175	112,50	162,50	312,50	218,75	193,75
Isoleu.	50	93,75	56,25	37,50	181,25	381,25	593,75	375	462,50	81,25	81,25	175	106,25	131,25	68,75	150
Ac. glu.	175	162,50	318,75	225	1918,75	1287,50	887,50	350	443,75	562,50	312,50	131,25	568,75	700	1418,75	2618,75
Ac. asp.	175	131,25	112,50	350	843,75	1068,75	1018,75	162,50	118,75	87,50	100	100	375	556,25	287,50	362,50
Arg.	0	0	0	0	125	375	250	293,75	225	56,25	56,25	62,50	0	présence	0	93,75
Phe.	50	181,25	93,75	43,75	112,50	256,25	325	187,50	300	212,50	56,25	306,25	68,75	162,50	43,75	75
Gly.	18,75	12,50	6,25	18,75	25	100	193,75	162,50	150	31,25	87,50	81,25	81,25	81,25	56,25	206,25
Hist.	31,25	37,50	18,75	31,25	18,75	250	237,50	137,50	225	118,75	87,50	243,75	68,75	206,25	68,75	87,50
Cyst.	traces				traces	918,75	81,25	traces	81,25							
Méth.								traces	12,50							
1-Méthyl-hist.					présence	présence		présence	présence	traces	traces	présence	traces			présence
Ethanolamine		traces	traces		traces	présence		présence	présence	traces						présence
I après leu.					présence		présence		présence	présence		présence	présence	présence	présence	présence
I avant Ala.					présence	présence	présence	présence	présence	présence						présence
I avant Lys.	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence

TABLEAU XIV

TABLEAU XV

VINCA MEDIA (FEUILLES)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC.

ACIDES AMINES	Févr. 67 19 H	Mars 67 19 H	Avr. 67 19 H	Mai 67 19 H	Juin 67 19 H	Juil. 67 19 H	Août 67 19 H	Sept. 67 19 H	Oct. 67 19 H	Nov. 67 19 H	Déc. 67 19 H
Ala.	3350	2687,50	6656,25	3562,50	2200	I268,75	900	725	906,25	87,50	581,25
	4462,50	7618,75	8062,50	3462,50	825	796,25	425	506,25	893,75	50	793,75
Asp. + Sér.	11875	3825	3575	I693,75	406,25	418,75	568,75	I37,50	468,75	I87,50	675
Pro.	I418,75	587,50	I275	3675	593,75	493,75	6381,25	593,75	I25	462,50	81,25
Tyr.	387,50	412,50	931,25	567,50	893,75	893,75	I62,50	500	531,25	50	256,25
Glu.	5200	5512,50	I000	350	0	traces	131,25	0	I68,75	0	traces
Val.	3506,25	I206,25	2431,25	I506,25	562,50	537,50	281,25	I43,75	212,50	I2,50	306,25
Thr.	présence	556,25	I650	487,50	I87,50	137,50	II2,50	I8,75	I31,25	traces	162,50
Leu.	IIII8,75	606,25	2231,25	437,50	I56,25	137,50	25	25	62,50	traces	81,25
Lys.	2I68,75	706,25	2I06,25	556,25	250	200	I87,50	93,75	I31,25	traces	112,50
Isoleu.	I337,75	531,25	I081,25	450	I62,50	100	31,25	25	62,50	traces	112,50
Ac. Glu.	943,75	981,25	I68,75	537,50	643,75	262,50	262,50	412,50	512,50	81,25	I037,50
Ac. Asp.	3412,50	I081,25	812,50	362,50	I68,75	I06,25	I00	87,50	212,50	I8,75	687,50
Arg.	présence importante	725	I237,50	275	I25	I00	traces	I8,75	50	traces	56,25
Phé.	812,50	218,75	956,25	I87,50	I62,50	137,50	50	62,50	I37,50	traces	162,50
Gly.	218,50	237,50	931,25	I81,25	I00	87,50	68,75	12,50	25	0	50
Hist.	750	325	300	206,25	I00	75	I06,25	43,75	62,50	traces	75
Cyst.											
Méth.	250		256,25	37,50	43,75		18,75		I8,75		25
1-Méthyl-hist.		présence			traces	37,50					présence
Ethanolamine		présence	traces		présence						
X après leu.	présence		présence	présence	traces	présence	présence	présence	présence		présence
X avant ala.		présence									présence
X avant lys.	présence	présence	présence	présence		présence	présence	présence	présence		présence

VINCA MINOR (FEUILLES)

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC.

Acides aminés	Sept. 66 18 H	Oct. 66 19 H	Nov. 66 19 H	Déc. 66 19 H	Janv. 67 19 H	Févr. 67 19 H	Mars 67 19 H	Avr. 67 19 H	Mai 67 19 H	Juin 67 19 H	Juil. 67 19 H	Août 67 19 H	Sept. 67 19 H	Oct. 67 19 H	Nov. 67 19 H	Déc. 67 19 H
Asp.	512,50	881,25	743,75	618,75	487,50	887,50	1062,50	1675	1768,75	1025	893,75	237,50	981,25	1125	868,75	287,50
Y	681,25	1725	918,75	775	975	2331,25	2243,75	893,75	2750	1337,50	1168,75	343,75	1243,75	1387,50	962,50	468,75
Asp. + Ser.	518,75	787,50	412,50	1256,25	443,75	1125	1156,25	612,50	2256,25	618,75	512,50	756,25	750	1275	931,25	443,75
Pro.	1818,75	1081,25	662,50	156,25	125	331,25	731,25	225	562,50	837,50	750	2937,50	1500	775	368,75	600
Thr.	131,25	143,75	75	37,50	18,75	81,25	300	81,25	631,25	506,25	262,50	112,50	200	131,25	81,25	18,75
Glu.	traces	100	traces	81,25	143,75	731,25	225	112,50	818,75	231,25	118,75	112,50	131,25	325	traces	traces
Val.	143,75	268,75	212,50	137,50	93,75	393,75	937,75	331,25	706,25	406,25	206,25	68,75	137,50	150	100	56,25
Thr.	100	125	62,50	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	87,50	62,50	100	100	présence	traces
Leu.	150	237,50	175	143,75	75	275	468,75	193,75	393,75	250	162,50	125	175	206,25	162,50	68,75
Lys.	137,50	175	137,50	150	100	225	256,25	118,75	381,25	181,25	162,50	81,25	150	193,75	118,75	75
Isoleu.	31,25	100	62,50	56,25	37,50	181,25	406,25	137,50	287,50	131,25	68,75	12,50	37,50	43,75	43,75	25
Am. Glu.	137,50	687,50	1000	1625	812,50	506,25	106,25	31,25	75	56,25	43,75	43,75	262,50	431,25	750	806,25
Am. Asp.	306,25	506,25	337,50	506,25	181,25	412,50	100	68,75	550	256,25	81,25	68,75	175	568,75	468,75	112,50
Arg.	0	325	262,50	181,25	81,25	318,75	462,50	162,50	481,25	150	162,50	406,25	825	831,25	581,25	168,75
Phe.	75	81,25	56,25	25	6,25	62,50	121,25	12,50	237,50	150	81,25	93,75	62,50	81,25	68,75	traces
Gly.	50	50	31,25	43,75	25	75	237,50	93,75	200	81,25	75	68,75	187,50	112,50	62,50	62,50
Ala.	81,25	75	37,50	62,50	43,75	68,75	31,25	12,50	100	43,75	37,50	62,50	43,75	62,50	62,50	25
Cyst.	87,50											56,25	56,25			
Meth.	traces															
N-Methyl-hist.		traces														
Ethanolamine	présence	présence	traces				présence					présence	présence			
X après leu.																
X avant Glu.																
X avant Lys.																

TABLEAU XVI

quatre acides aminés suivants : l'acide γ aminobuty-- rique, l'alanine, l'asparagine et la proline. Une --- quantité nettement moindre mais cependant importante- apparaît pour la glutamine et la valine ; et enfin,-- l'acide glutamique, l'acide aspartique et la tyrosine existent en une certaine concentration.

Les autres acides aminés sont en quantité beau coup plus faible, et même très faible en ce qui concer ne la glycine, l'histidine et la phénylalanine.

Quant à l'acide α aminoadipique, à l'ornithine, à la méthionine, ou au tryptophane, ils ne sont pas dé celables sur nos chromatogrammes.

Ces résultats sont en accord avec ceux des an- nées antérieures (1964, 1965 et 1966) ; les acides di- carboxyliques et la proline ayant pris une place que-- les résultats partiels précédents laissaient supposer.

D'après ces tableaux, on constate donc une va- riation quantitative des acides aminés identiques pour les trois Pervenches. (Seule l'arginine échapperait à- la règle, comme en 1965, et serait proportionnellement en quantité plus importante chez le *Vinca minor* que -- chez le *Vinca major* ou le *Vinca media*).

- Avant d'étudier les courbes suivantes, il--- faut savoir qu'en 1967 la floraison eut lieu très tôt, dès la fin du mois de février, et que les feuilles de- ce mois étaient extrêmement jeunes. Ces courbes qui -- schématisent de manière très visible les résultats ob- tenus, indiquent que chez le *Vinca major et chez le--- Vinca media la plupart des acides aminés présentent--- une valeur maximale moyenne en mars*, une très faible-- recrudescence de l'anabolisme (ou une diminution du ca tabolisme) en octobre, une valeur minimale en novembre et une reprise de l'anabolisme en décembre.

Toutefois, la tyrosine a une valeur maximale nettement plus tardive, *et surtout deux acides semblent présenter un métabolisme particulier : l'acide glutamique qui a une valeur maximale très nette en décembre et la proline dont la valeur maximale se situe encore plus nettement en août.*

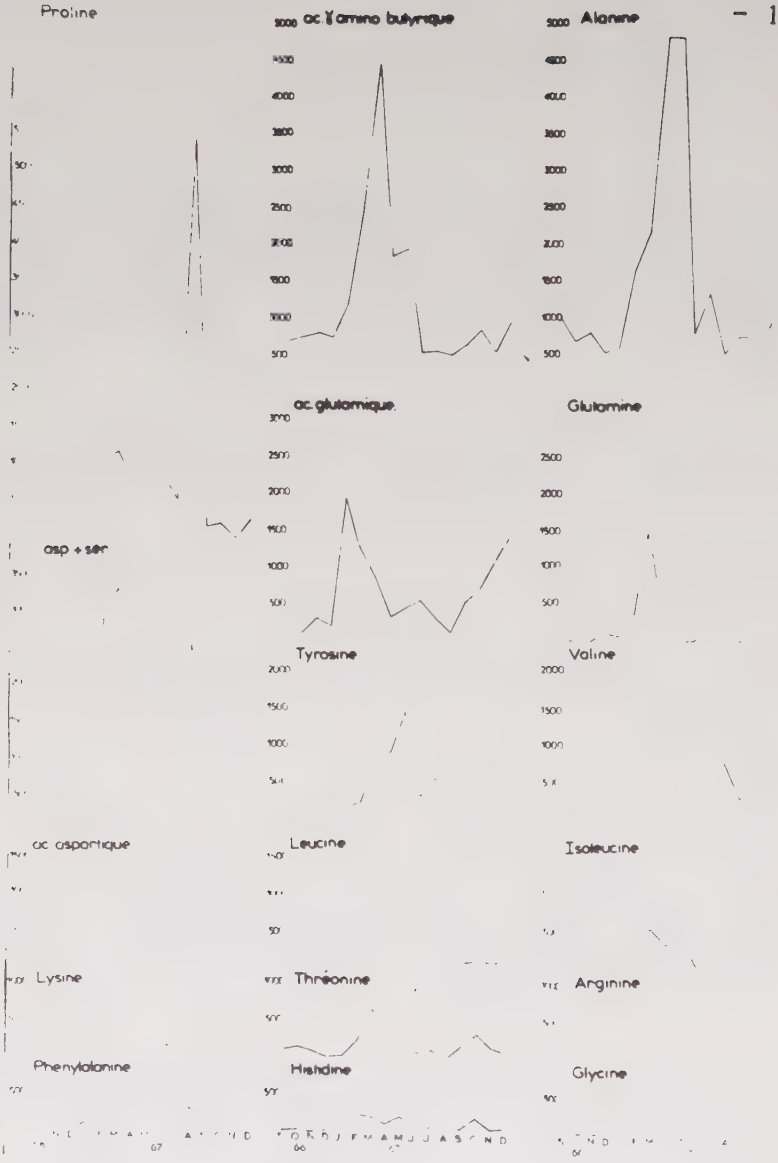
L'ensemble de courbes représentant les résultats obtenus chez le *Vinca minor indique des variations légèrement différentes et décalées dans le temps. Les courbes sont également beaucoup plus irrégulières que celles des autres Pervenches. Le microclimat de la station en serait la cause. La plupart des acides aminés présentent une valeur maximale moyenne en mai (et en mars),* une recrudescence de l'anabolisme (ou une diminution du catabolisme) relativement importante en octobre, et une valeur minimale en Janvier et en Août.

L'acide aspartique, l'arginine et surtout la thréonine ont des valeurs importantes plus tardives.

Cependant, ces courbes montrent un phénomène identique à celui observé chez le Vinca major et le Vinca media, à savoir la quantité maximale d'acide glutamique en décembre et de proline en août.

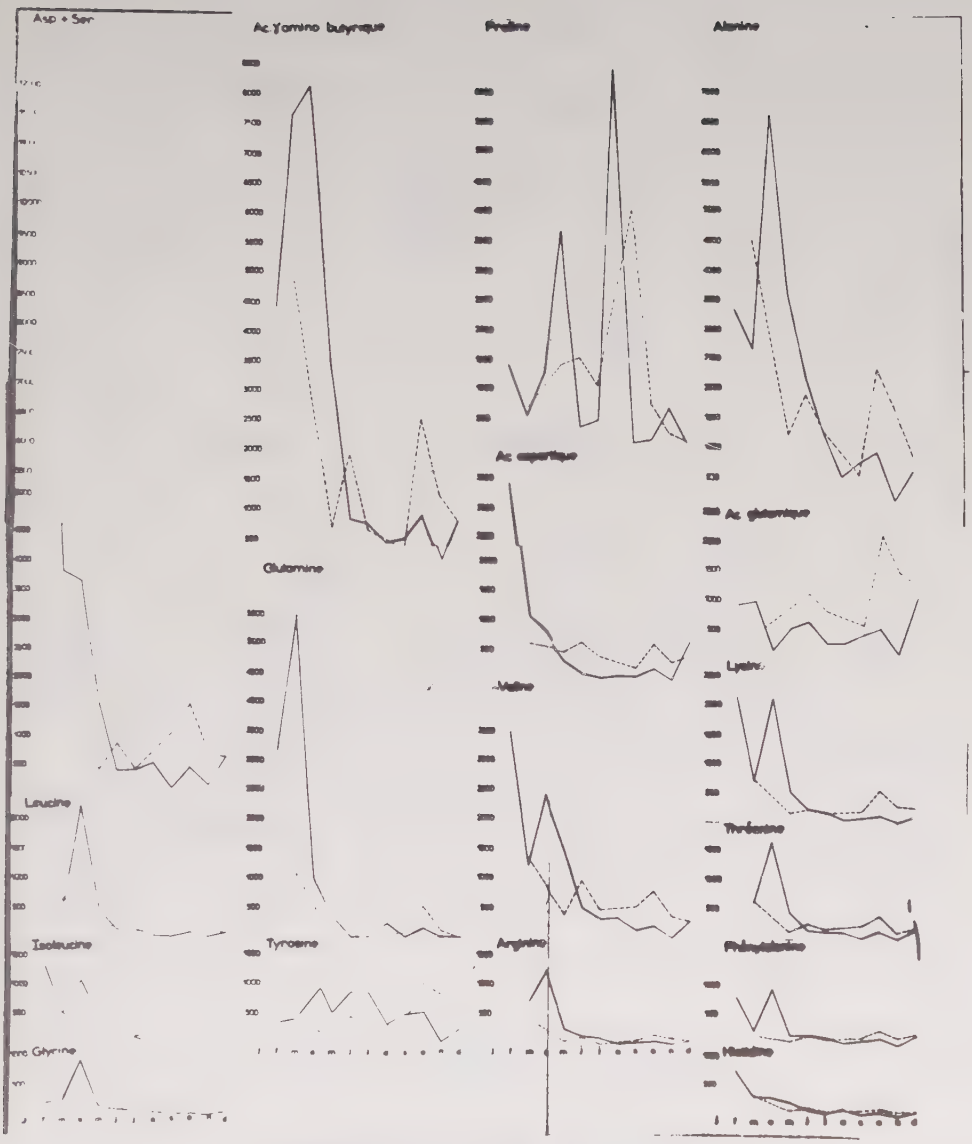
- D'autre part, si l'on compare les acides aminés totaux des trois Pervenches, l'on se rend compte, d'après la courbe, que les valeurs maximales sont situées en février, mars, avril et que des valeurs relativement importantes apparaissent en août pour le *Vinca major,* en août et octobre pour le *Vinca media,* en juin, décembre et surtout octobre pour le *Vinca minor.*

L'anabolisme des acides aminés serait donc maximum au moment de la floraison et présenterait une certaine recrudescence au moment de la fructification.



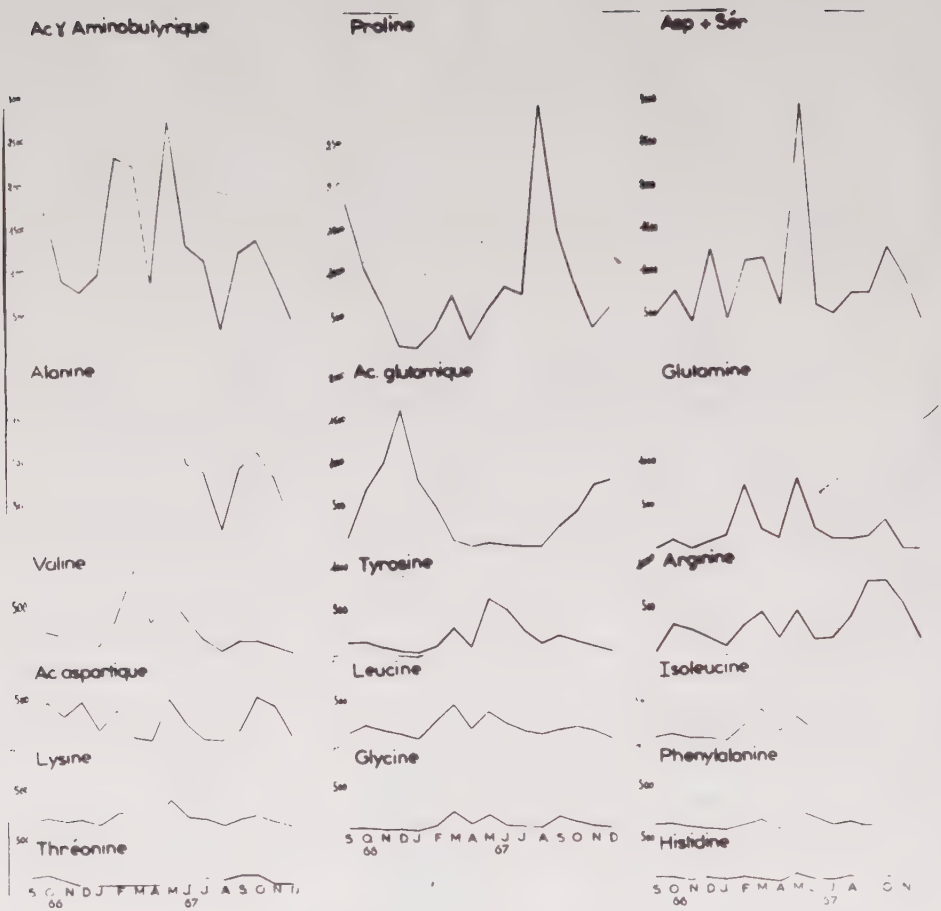
Evolution de la teneur en acides aminés libres chez le Vinca major L. au cours de la végétation

En ordonnée micromoles pour 100 g de poids sec
En abscisse mois des années 1966 et 1967
Février, Mars Floraison
Juillet Août Fructification



Evolution de la teneur en acides aminés libres chez le Vinca media Hoffg et Link. au cours de la végétation

En ordonnée : micromoles pour 100g de poids sec
En abscisse : mois des années 1966 et 1967
– – – – – : 1966
——— : 1967



Evolution de la teneur en acides aminés libres chez le Vinca minor L. au cours de la végétation

En ordonnée micromoles pour 100g de poids sec
En abscisse mois des années 1966 et 1967

FEUILLES

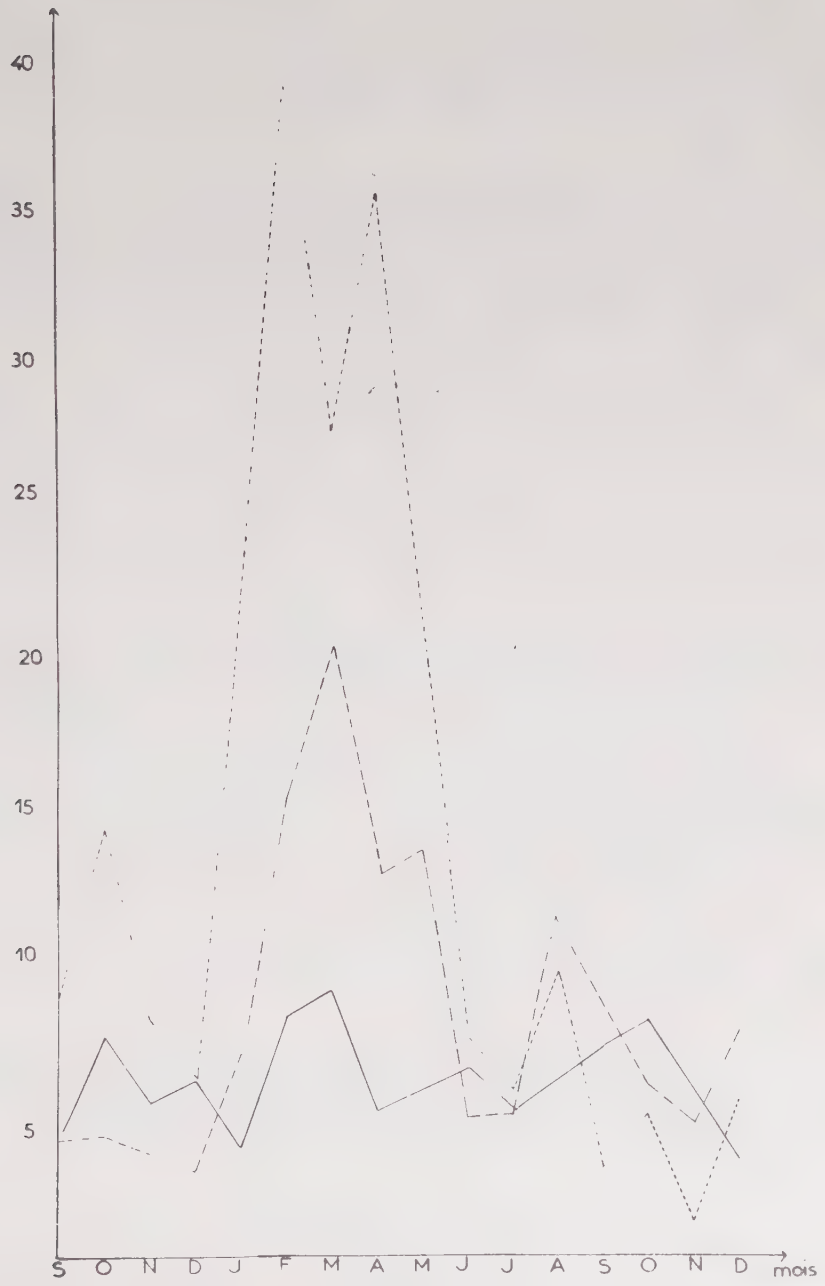
ACIDES AMINES sep 1966 _ déc 1967

VINCA MINOR ———

VINCA MAJOR – – – –

VINCA MEDIA .....

Micromoles pour 100 mg de poids sec



Dosages des acides aminés des boutons floraux et des fleurs au cours des années 1965, 1966 et 1967.

Nous avons étudié en 1965 les variations journalières du taux des acides aminés dans les fleurs du *Vinca minor*.

D'après les prélèvements effectués à 9 H, 16 H et 19 H, on observe selon le tableau XVII et la courbe correspondante que, contrairement aux feuilles, l'anabolisme des acides aminés dans les fleurs est plus important au milieu de la journée qu'au début de la soirée.

- Les tableaux XVIII et XIX représentant les résultats de 1966 et de 1967 indiquent un fait très net:

Que ce soit chez le Vinca major, chez le Vincamedia ou chez le Vinca minor, nous obtenons toujours les mêmes variations relatives.

Seules les valeurs absolues des acides aminés (comme dans le cas des feuilles) sont nettement moindres chez le *Vinca minor* que chez les deux autres Pervenches.

Les acides aminés les plus importants sont, par ordre d'importance décroissante, l'asparagine, la proline et l'alanine, puis l'acide γ amino butyrique (moins important que dans les feuilles) et la valine.

Comme l'étude qualitative le laissait prévoir, nous avons réussi à doser la méthionine, qui est présente en très faible quantité.

- D'autre part les courbes suivantes, résumant ces tableaux, montrent un phénomène également très visible et identique pour tous les acides aminés (sauf la glutamine) :

TABLEAU XVII

VINCA MINOR (FLEURS 1965)

Micromoles d'acides aminés pour 100 g de poids sec.

ACIDES AMINES	9 H	16 H	19 H
Ala.	1931,25	2756,25	1962,50
γ	693,75	950	412,50
Asp. (+glu.)	1437,50	3237,50	2030,25
Pro.	968,75	1831,25	950
Tyr.	68,75	112,50	68,75
Sér.	393,75	381,25	200
Val.	450	825	450
Thr.	181,25	537,50	150
Leu.	375	681,25	381,25
Lys.	262,50	393,75	200
Isoleu.	212,50	418,75	218,75
Ac. glu.	137,50	156,25	81,25
Ac. asp.	206,25	450	187,50
Arg.	218,75	présence	250
Phé.	112,50	137,50	62,50
Gly.	225	356,25	143,75
Hist.	168,75	318,75	193,75
Orn.	0	0	0
Méth.	traces	traces	traces
α	0	0	0
Cyst.	traces	traces	traces
β	0	traces	traces
β ala.	traces	présence	présence
Ethanolamine	0	traces	0
X? avant lys.	présence	présence	présence
X? après leu.	présence	présence	présence
X? après gly.	présence	présence	présence
Micromoles d' A. A. totaux pour 100 mg de poids sec.			
A. A. totaux	7,59	13,54	7,94

VINCA MINOR fleurs 1965
micromoles acides aminés totaux
pour 100 mg de poids sec.

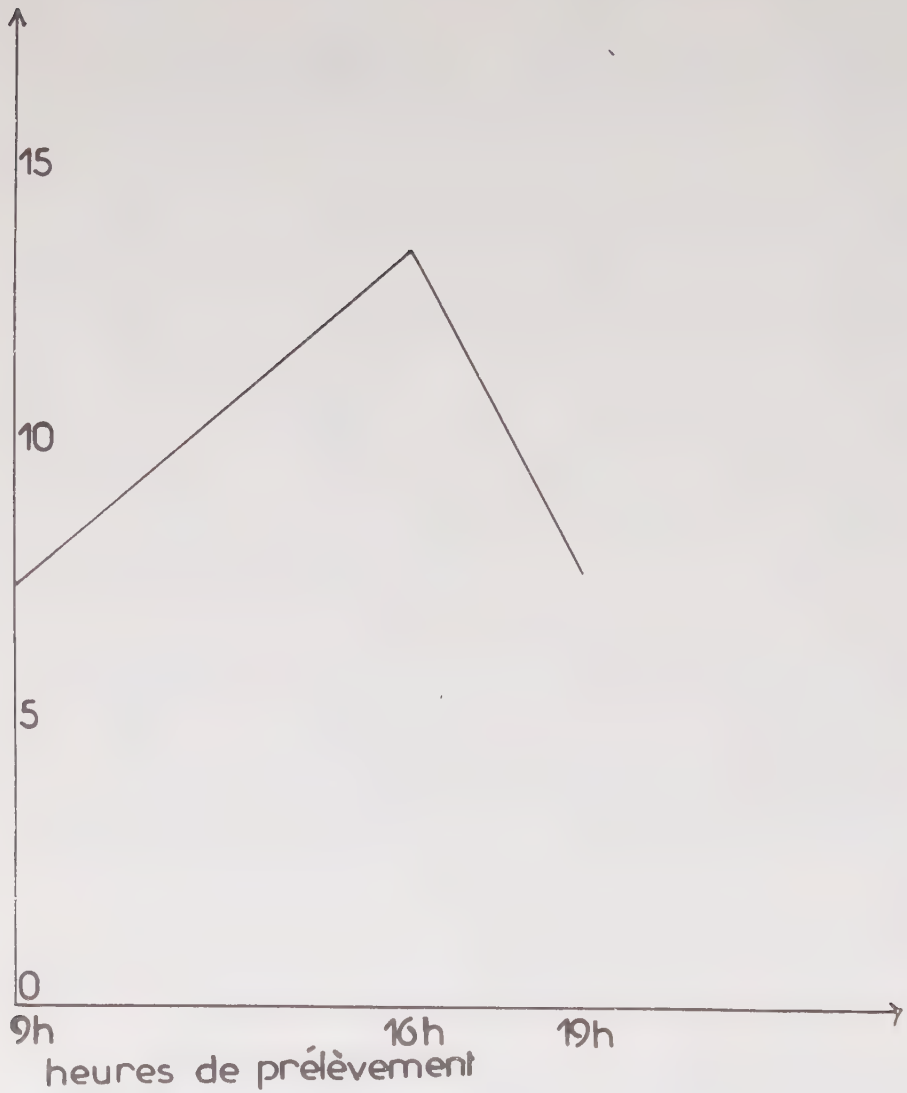


TABLEAU XVIII

VINCA MAJOR

Boutons floraux et Fleurs 1966 et 1967

VINCA MEDIA

Boutons floraux 1967

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g. DE POIDS SEC.

ACIDES AMINES	V. Major 66 Boutons verts	V. Major 66 Boutons fermés violets	V. Major 66 Boutons ouverts violets	V. Major 66 Fleurs épanouies	V. Major 66 Fleurs en train de se faner		V. Major 67 Boutons verts	V. Major 67 Boutons violets	V. Major 67 Fleurs		V. Media 67 Boutons verts
Asp.	3056,25	1975	1093,75	2100	1083,26		5681,25	1962,50	1493,75		4332,90
Thr.	1562,50	825	512,50	437,50	555,52		2543,75	543,75	318,75		2721,95
Asp. (+ Ser.)	10425	5662,50	3600	3000	3173,40		12312,50	2081,25	1512,50		7677,01
Pro.	4356,25	4225	3987,50	3112,50	3659,48		5337,50	5050	2618,75		5743,87
Tyr.	862,50	700	381,25	présence	173,60		1356,25	231,25	125		72,21
Glu.	0	368,75		487,50	611,07		traces	traces	262,50		présence
Val.	2750	2043,75	1456,25	950	923,55		3031,25	618,75	481,25		1810,93
Thr.	1312,50	962,50	731,25	687,50	687,45		1706,25	362,50	287,50		présence
Leu.	1162,50	743,75	518,75	312,50	213,26		1437,50	250	156,25		1088,78
Lys.	806,25	418,75	268,75	193,75	173,60		1081,25	193,75	150		1055,45
Isoleu.	1168,75	856,25	593,75	375	312,48		1256,25	243,75	175		799,92
Ac. Glu.	418,75	518,75	468,75	356,25	458,30		531,25	187,50	168,75		299,97
Ac. asp.	1143,75	556,25	506,25	362,50	236,09		1775	306,25	393,75		949,90
Arg.	837,50	393,75	287,50	243,75	145,82		1312,50	200	87,50		1061
Phe.	456,25	462,50	256,25	200	111,10		843,75	187,50	93,75		72,21
Gly.	318,75	1001	62,50	112,50	83,32		512,50	68,75	62,50		627,71
Hist.	562,50	537,50	43,75	331,25	319,42		575	250	193,75		494,39
Orn.											
Méth.	125	125	81,25	93,75	62,49		156,25	81,25	50		
Méthyl-Hist.	présence	présence	présence	présence	présence		présence	présence	présence		présence
Ethanolamine	présence	présence					présence				
? avant als.	présence	présence	présence								
? près leu.	présence	présence	présence	présence	présence		présence	présence	présence		présence
? avant lys.	présence	présence	présence	présence	présence		présence	présence	présence		présence

VINCA MINOR

Boutons floraux et fleurs 1966 et 1967

MICROMOLES D'ACIDES AMINES POUR 100 g DE POIDS SEC.

ACIDES AMINES	V. minor 66 Boutons verts	V. minor 66 Boutons fermés violets	V. minor 66 Boutons ouverts violets	V. minor 66 Fleurs en train de s'épanouir	V. minor 66 Fleurs épanouies	V. minor 66 Fleurs en train de se faner		V. minor 67 Boutons violets	V. minor 67 Fleurs
Ala.	1625	1818,75	1125	1275	875	1131,25		1262,50	881,25
γ	1462,50	1593,75	1231,25	981,25	831,25	618,75		1237,50	818,75
Asp. (+ Sér.)	3512,50	3843,75	2562,50	2168,75	1625	1437,50		4975,50	1993,75
Pro.	2631,25	2631,25	2393,75	1125	1718,75	918,75		3993,75	1700
Tyr.	312,50	368,75	231,25	125	62,50	81,25		412,50	112,50
Glu.	traces	212,50	393,75	243,75	268,75	150		traces	112,50
Val.	975	1162,50	968,75	731,25	593,75	506,25		1862,50	8[illegible],75
Thr.	368,75	462,50	312,50	250	200	168,75		481,25	175
Leu.	818,75	1031,25	843,75	562,50	375	350		10[illegible]7,50	450
Lys.	343,75	325	231,25	168,75	131,25	137,50		2[illegible]5,75	1[illegible]7,50
Isoleu.	475	550	437,50	293,75	231,25	200		[illegible]	350
Ac. glu.	1025	1600	1468,75	1037,50	931,25	5[illegible]3,75		[illegible]	537,50
Ac. asp.	1412,50	812,50	575	481,25	287,50	306,25		[illegible]	575
Arg.	456,25	493,75	262,50	175	193,75	118,75		[illegible]	21[illegible],50
Phé.	212,50	218,75	112,50	62,50	43,75	[illegible]		[illegible]	[illegible]
Gly.	131,25	185,25	75	156,25	[illegible]	100		[illegible]	[illegible]
Hist.	318,75	406,25	393,75	231,25	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]
Orn.									
Méth.	25	56,25	81,25	56,25	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]
Méthyl-Hist.		présence		présence	présence	présence			[illegible]
Ethanolamine		présence	presence	presence				[illegible]	
X? avant ala.									
X? après leu.	présence	présence	présence	présence	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]
X? avant lys.	présence	présence	présence		[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]

TABLEAU XIX

Les boutons verts renferment une quantité d'acides aminés très supérieure à celle des boutons violets et des fleurs ; la concentration de ces acides-- diminue des boutons fermés verts aux fleurs en train de se faner en passant par les boutons fermés violets, les boutons ouverts violets, les fleurs en train de--- s'épanouir et les fleurs épanouies.

Dosages des acides aminés des racines au cours de l'année 1967.

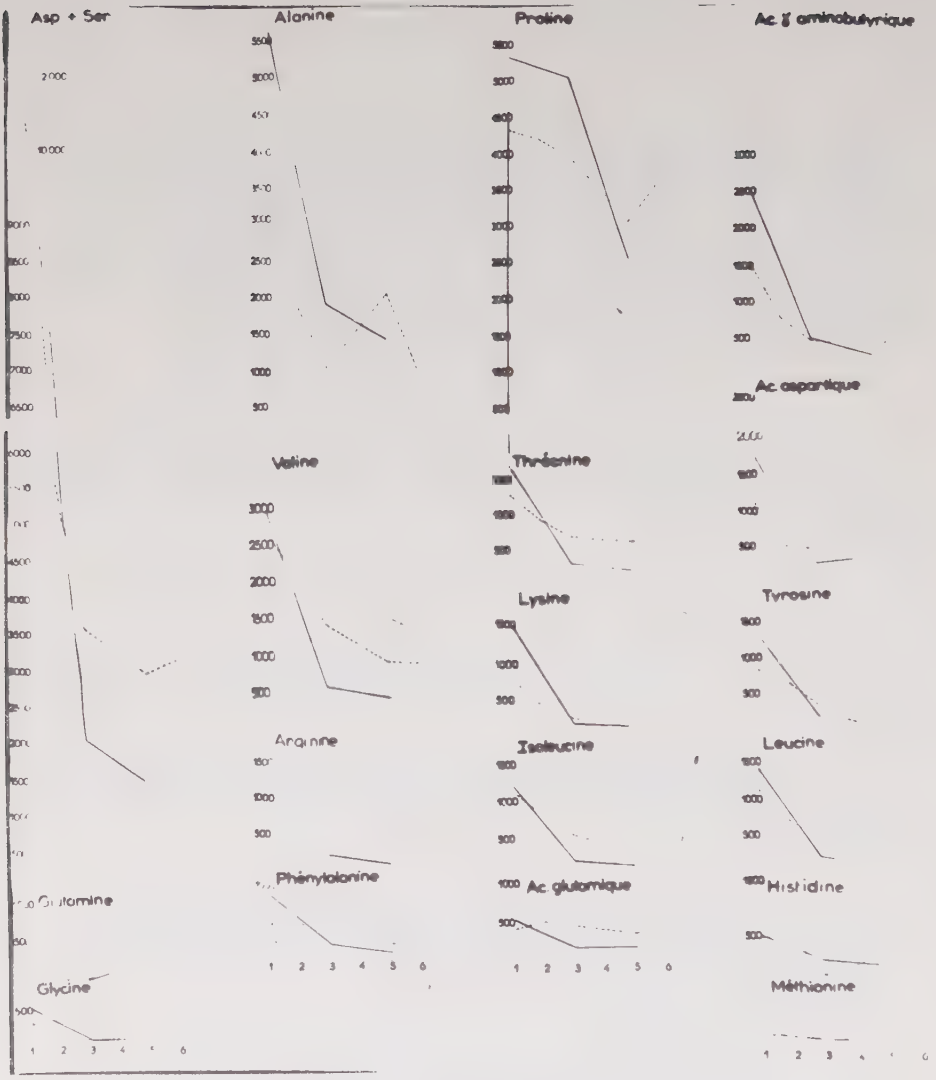
Le tableau XX et les courbes suivantes indiquent *que les racines contiennent très peu d'acides-- aminés.*

La tyrosine et la phénylalanine sont en quantité extrêmement faible, et la proline est presque absente.

Seule l'arginine, et à un moindre degré, l'acide aspartique, l'alanine, l'acide γ amino butyrique et l'acide glutamique sont toujours en quantité relativement importante.

L'arginine est également en forte concentration, mais surtout chez le Vinca media et le *Vinca minor.* (Il y a peut-être là une possibilité de différencier le *Vinca major,* du *Vinca media).*

D'autre part, la concentration de chaque acide aminé varie selon les mois de la même manière que les fluctuations des acides aminés totaux sauf, chez le *Vinca minor,* l'acide aspartique dont la quantité-- diminue de Juin à décembre et l'acide glutamique de-- même que la glutamine qui présentent un plateau minimum en septembre, octobre et novembre.



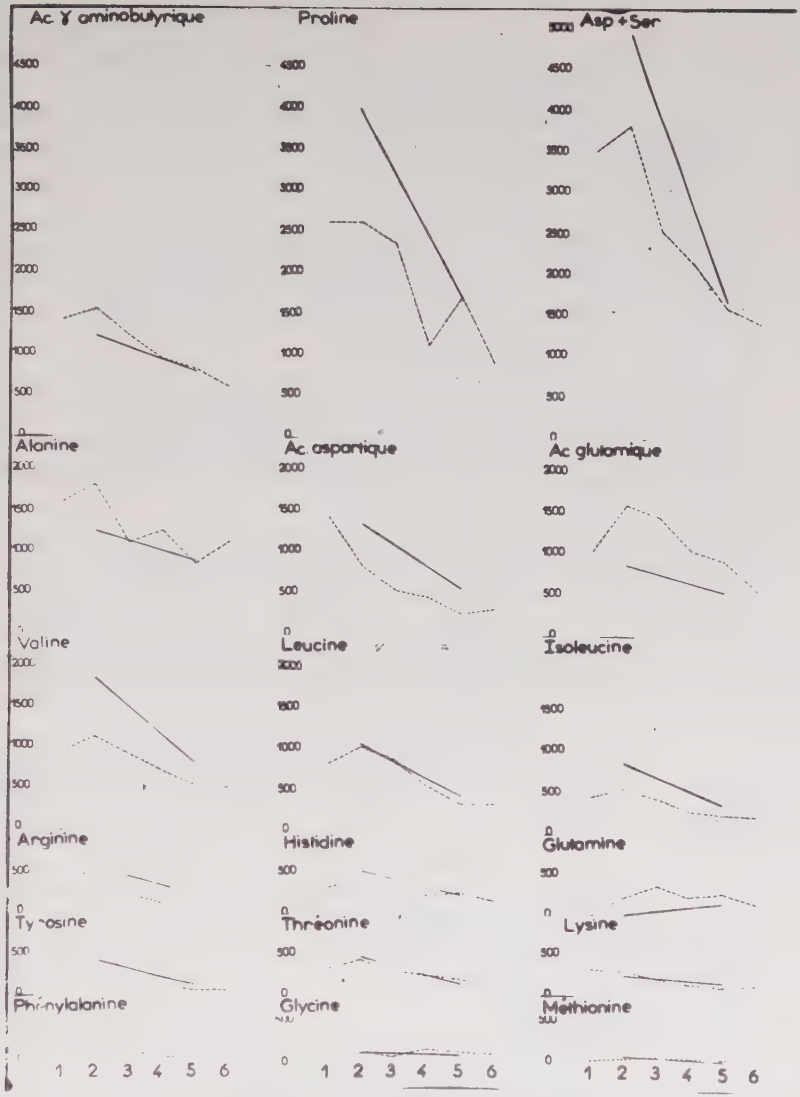
Boutons floraux et fleurs du Vinca major L.

Evolution de la teneur en acides aminés libres au cours de la floraison

En ordonnée micromoles pour 100 g de poids sec
En abscisse stades de floraison

1 boutons fermés verts
2 boutons fermés violets
3 boutons ouverts violets
4 fleurs en train de s'épanouir
5 fleurs épanouies
6 fleurs en train de se faner

1966
1967



Boutons floraux et fleurs du Vinca Minor L.

Evolution de la teneur en acides aminés libres au cours de la floraison

En ordonnée : micromoles pour 100 mg de poids sec
En abscisse : stades de floraison

1 boutons fermés verts
2 boutons fermés violets
3 boutons ouverts violets
4 fleurs en train de s'épanouir
5 fleurs épanouies
6 fleurs en train de se faner

Ces courbes montrent que, sauf au mois de Juin, les variations des acides aminés suivent celles des alcaloïdes.

En effet, le *Vinca major* présente une concentration en acides aminés importante et maximale en juin, moindre en novembre, et faible en septembre et octobre.

Chez le *Vinca media*, la quantité maximale se situe en novembre ; elle est moindre en septembre, octobre, décembre, et très faible en Juin.

Il y aurait peut-être là une nouvelle différence entre le *Vinca major* et le *Vinca media*.

Les variations des acides aminés chez le *Vinca minor*, se rapprochent de celles constatées chez le *Vinca major*.

La quantité maximale est située en Juin ; elle est moindre en octobre et décembre, faible en septembre et novembre.

Ces courbes et ce tableau montrent également que dans les racines, contrairement aux feuilles et aux fleurs, les valeurs absolues des acides aminés sont plus importantes chez le *Vinca minor* que chez les deux autres Pervenches.

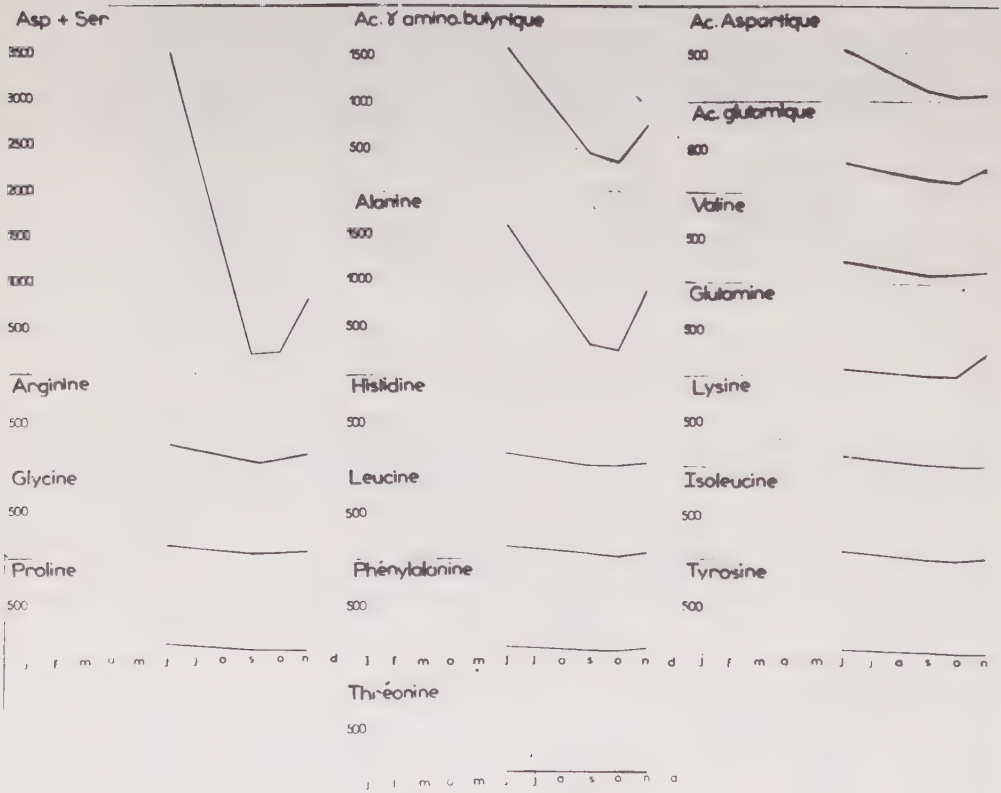
Selon ces résultats, on constate l'existence de quelques possibilités de différencier le *Vinca major* du *Vinca media* par l'analyse de leurs racines.

L'étude chimique des racines présenterait donc une certaine importance chimiotaxinomique alors que celle des feuilles présenterait une importance quantitative certaine.

MI[illegible] SEC.

ACIDES AMINES	[illegible]				VINCA MEDIA					VINCA MINOR				
	Juin	Septembre	Octobre	Novembre	Juin	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Juin	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1200	543,75	[illegible]	381,25	412,50	250	250
γ	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	206,25	[illegible]	687,50	1081,25	593,75	1218,75	400	431,25	318,75	[illegible]
[illegible] + Ser.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	6718,75	3012,50	3218,75	2200	3406,25	[illegible]	2475
Pro.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0		traces	37,50	traces	75	87,50	62,50	traces	75
Thr.	[illegible]	traces	traces	[illegible]	0	traces	12,50	50	[illegible]	37,50		0	traces	0
[illegible]		traces	[illegible]	[illegible]	0	0	traces	traces	237,50	[illegible]	0	0	traces	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	150	0	106,25	93,75	137,50	[illegible]	250	68,75	200	18,75	-
[illegible]	traces	traces	traces	traces	0	traces	0	traces	traces	375	0	0	0	0
[illegible]	[illegible]	[illegible]	25	50	0	37,50	62,50	81,25	62,50	112,50	12,50	12,50	50	12,50
[illegible]	[illegible]	[illegible]	5	50	75	37,50	68,75	87,50	112,50	112,50	62,50	25	31,25	68,75
Isoleu.	[illegible]	[illegible]	traces	[illegible]	0	25	37,50	43,75	56,25	112,50	[illegible]	112,50	traces	12,50
Ac. glu.	[illegible]	156,25	[illegible]	[illegible]	0	137,50	131,25	331,25	343,75	2893,75	[illegible]	362,50	331,25	495,75
Ac. asp.	[illegible]	106,25	[illegible]	[illegible]	0	325	1181,25	1037,50	1062,50	[illegible]	912,50	806,25	462,50	368,75
Arg	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	225	262,50	1818,75	Présence	1962,50	traces	793,75	[illegible]	1062,50
Phe.	12,50	traces	traces	[illegible]	0	traces	6,25	18,75	traces	68,75	0	0	traces	0
[illegible]	178,75	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	37,50	50	62,50	31,25	87,50	25	18,75	[illegible]	12,50
[illegible]	125	[illegible]	traces	[illegible]	31,25	18,75	18,75	56,25	56,25	[illegible]	[illegible]	43,75	[illegible]	43,75
[illegible]														
[illegible]														
α	N E A N T													
[illegible]														
β														
[illegible]										[illegible]				
[illegible] avant lys	présence	présence	[illegible]	présence	présence	[illegible]		présence	présence	[illegible]	présence		[illegible]	

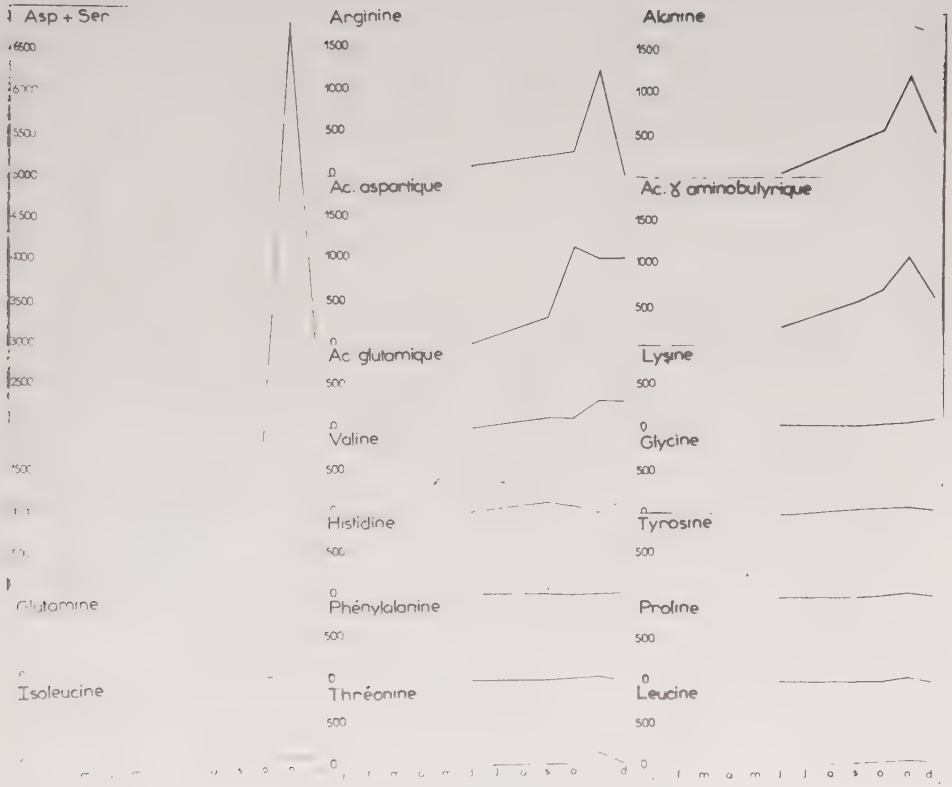
T A B L E A U X X



Racines du Vinca major L.

Evolution de la teneur en acides aminés libres au cours de la végétation

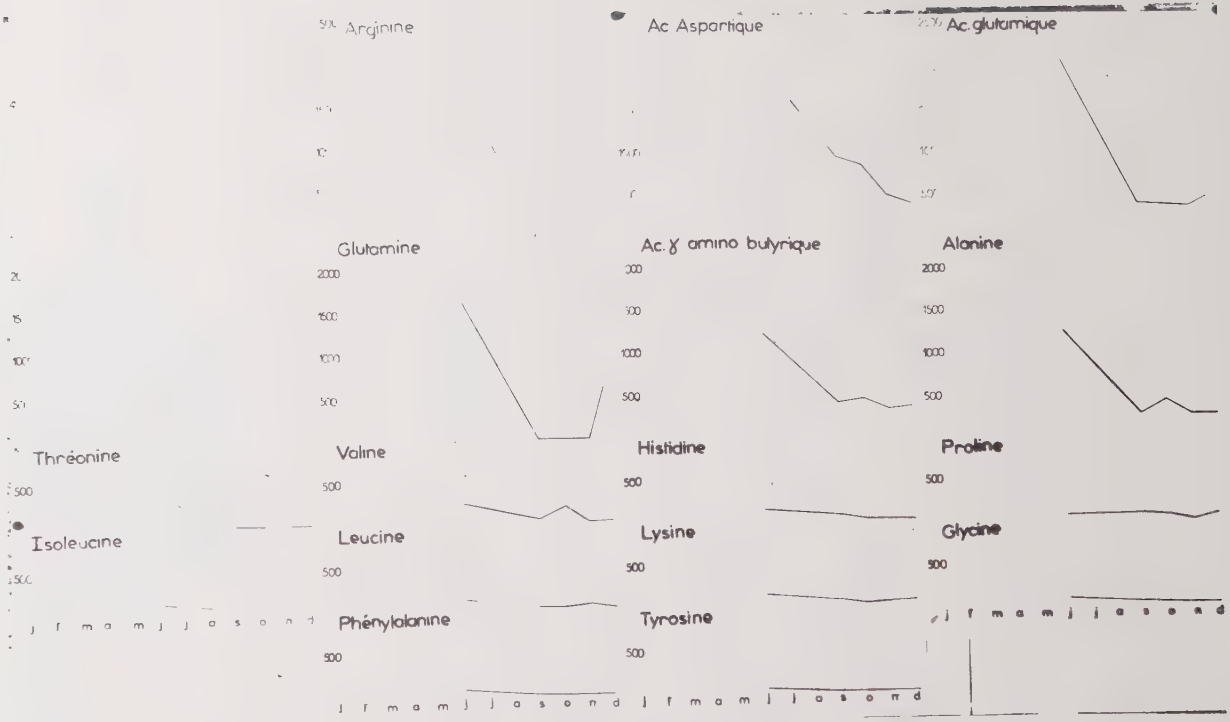
En ordonnée : micromoles pour 100 g de poids sec.
En abscisse : mois de l'année 1967



Racines du Vinca media Hoffg. et Link.

Evolution de la teneur en acides aminés libres au cours de la végétation

En ordonnée micromoles pour 100g de poids sec.
En abscisse mois de l'année 1967.



Racines du Vinca minor L.

Evolution de la teneur en acides aminés libres au cours de la végétation.

En ordonnée : micromoles pour 100 g de poids sec.
En abscisse : mois de l'année 1967

4. CONCLUSIONS.

Ces résultats semblent indiquer que beaucoup d'acides aminés libres dans les plantes sont des formes transitoires, mais qui jouent un rôle très important dans le métabolisme azoté des plantes (BRONISLAW gej 1963).

En particulier, il est admis actuellement que les alcaloïdes sont formés, directement ou indirectement, à partir des acides aminés libres (KLYSHEV 1964, VERZAR-PETRI 1963, MADAN 1967).

L'intérêt chimiotaxinomique de cette étude semble cependant secondaire car les différences observées se situent dans une plus large part au niveau des acides aminés eux-mêmes qu'au niveau des espèces végétales analysées.

Dans tous les organes, des trois *Vinca*, les acides aminés les plus importants sont l'asparagine, l'alanine et l'acide γ amino butyrique.

- En ce qui concerne les *fleurs*, la proline s'ajoute à cette liste, et les boutons fermés encore verts renferment une quantité d'acides aminés très supérieure à celle des boutons violets et des fleurs.

- En ce qui concerne les *racines*, l'acide aspartique et l'acide glutamique, s'ajoutent à cette liste, ainsi que l'arginine, mais la proline est presque inexistante. D'autre part, l'étude de ces racines révèle quelques possibilités de différencier le *Vinca major* du *Vinca media* par l'analyse des variations des acides aminés.

- En ce qui concerne les *feuilles*, les acides présents dans les trois espèces, varient quantitativement, sensiblement de la même manière sauf la proline;

les acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) intéressants à priori par le rôle qu'on leur attribue dans la biosynthèse des métabolites secondaires (alcaloïdes), selon les résultats d'expériences réalisées avec des précurseurs marqués ne semblent pas avoir ici une importance primordiale.

La tyrosine se trouve en quantité moyenne, la phénylalanine en faible quantité et le tryptophane à l'état de traces quand on peut détecter sa présence. *Cette extrême rareté du tryptophane vient peut-être du fait qu'il est, comme l'acide glutamique utilisé au fur et à mesure de sa formation.*

En effet, il semble que dans les feuilles des trois Pervenches les variations particulières de l'acide glutamique seraient dues au fait que cet acide est très facilement décarboxylé en acide γ amino butyrique.

La décarboxylation en acide γ amino butyrique a lieu surtout au moment de la floraison.

Une étude enzymologique est en cours au laboratoire ; nous avons ainsi identifié chez les trois *Vinca* la présence de la L-glutamate-I-carboxy-lyase (4.I.I.I5) ; cette enzyme aurait une activité moindre chez le *Rauwolfia serpentina* puisque MADAN (1967) signale peu d'acide γ amino butyrique et par contre une grande quantité d'acide glutamique.

Bien que les techniques d'extraction soient inspirées d'un principe identique, les concentrations relatives sont légèrement différentes. MADAN mentionne, en effet, la prédominance de la sérine, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, et de l'alanine puis il cite en moindre importance l'asparagine, la glutamine, la thréonine, la proline, la valine, la tyrosine, la phénylalanine et le mélange leucine + isoleucine ; l'acide γ amino butyrique n'étant cité qu'en suite avec la lysine et l'arginine.

Selon les résultats de nos dosages, l'alanine est également en quantité importante mais non la séri ne; l'acide aspartique, et l'acide glutamique n'ont-- que des vàleurs moyennes ; mais surtout l'asparagine, l'acide γ amino butyrique la proline et parfois la--- glutamine semblent en forte concentration.

Ces faits nous suggèrent que l'analyse in situ des processus enzymatiques pourrait sans doute appor-- ter une contribution importante à l'étude de la chimio taxinomie.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES ALCALOIDES

CHAPITRE I

ETUDE QUALITATIVE

TRAVAUX ANTERIEURS

Il est admis actuellement que de nombreux alcaloïdes peuvent être synthétisés dans les plantes à-partir des acides aminés (HEGNAUER 1958).

En particulier, les alcaloïdes indoliques dériveraient du tryptophane, de la tryptamine ou de l'acide anthranilique (MADAN 1967).

Des expériences réalisées avec des précurseurs radioactifs par LEETE ont confirmé que le tryptophane était un précurseur direct des alcaloïdes (1965 et 1966) La portion non dérivée du tryptophane, chez ces alcaloïdes, proviendrait d'une combinaison linéaire de trois unités acétate (BATTERS BY 1964).

Les hypothèses biogénétiques actuelles sur les alcaloïdes indoliques font intervenir l'union de la tryptamine avec une unité en C_{10} "monoterpénoïde" dont l'enchainement se retrouve dans les glucosides présents chez les Gentianacées, Loganiacées, Apocynacées, Oléacées, toutes de l'ordre des Gentianales (Contortées).

On retrouve aussi ces glucosides chez les Rubiacées dont les affinités embryologiques avec les-- gentianales sont connues.

Les différentes cyclisations de l'unité en-- C_{10} via un intermédiaire "corynane" conduisent aux-- enchainements des divers alcaloïdes indoliques (POISSON 1961 et 1965).

Les Pervenches élaborant de tels alcaloïdes, il nous a semblé intéressant d'étudier comparativement-- les variations de ces alcaloïdes et des acides-aminés.

L'extraction des alcaloïdes totaux peut être réalisée de diverses manières, mais toujours selon le même principe qui consiste à imprégner la poudre avec de l'ammoniaque, à extraire par un solvant organique-(méthanol, éther, benzène, acétate d'éthyle, alcool-- absolu, dichloro-éthylène ou un mélange éther-chloroforme), à reprendre l'extrait desséché par une solu-- tion aqueuse acide, puis à alcaliniser cette solution aqueuse et à extraire par le chloroforme, l'éther, ou un mélange de ces deux solvants en proportions diverses (PARIS 1958, PLAT 1965, VOSKOBOINIK 1961).

Les techniques de séparation sont très nom--- breuses mais la méthode de SVOBODA par chromatographie sur colonne (SVOBODA 1964) sert de référence lorsque-- l'on veut avoir une séparation très poussée, des alcaloïdes des Pervenches.

Les méthodes de chromatographie sur colonne -- d'alumine (FARNSWORTH 1962, GOSSET 1962) sont parfois-remplacées, ou plutôt complétées, par l'emploi du pa-- pier (qui peut être imprégné de mélanges tampons) et--

de divers solvants, à base de benzène, de butanol,-- d'acide acétique, de formamide, de chloroforme et--- d'éther (DEBSKA 1959, LYAPUNOVA 1964), ou par l'em-- ploi de la couche mince de gel de silice et de sol-- vants à base de chloroforme, de méthanol, d'hexane,- de benzène ou d'acétate d'éthyle, (FARNSWORTH 1961-- et 1962, BAUEROVA 1961, INAGAKI 1964, PLAT 1963) mais l'emploi du papier ou de la couche mince n'est utili sé par ces auteurs que pour des séparations de mélan ges peu complexes. *En effet, la chromatographie sur- colonne est toujours utilisée au préalable pour obte nir un certain nombre de fractions à partir de l'ex- trait étudié et ce sont ces fractions qui sont analy sées ultérieurement au moyen de la chromatographie-- sur papier ou en couche mince.*

Par cet ensemble de techniques chromatogra-- phiques, les alcaloïdes suivants ont été mis en évi- dence chez les Pervenches indigènes (PLAT 1963, JANOT 1965).

	VINCA MAJOR	VINCA MEDIA	VINCA MINOR
Type Yohimbine	Réserpine (?) Akuammine Vincamajine Vinca majoréine Méthoxy-10 Vello- simine Alcaloïde V (oxin- dolique) (Vincamédine (?)	Vincamédine Vincamajine Sarpagine Vellosimine Akuammidine Vincadiffine	

	VINCA MAJOR	VINCA MEDIA	VINCA MINOR
Type Vincamine	Vincamine Vincine	Vincamine	Vincamine Vincine Vincaminine Vincinine Vincanorine
Type Aspidosper-mine		Vinca-difformine	(-) Vinca-difformine Minovine Minovincine Minovincinine Méthoxy-mino-vincine Vincaminorine Vincamidine Vincaréine
Type Québrachamine			Vincadine Vincaminoréine

TRAVAUX PERSONNELS

A) CHOIX DES TECHNIQUES.

I. EXTRACTION :

Après de nombreux essais, nous avons adopté la technique d'extraction suivante :

- Prise de départ : 100 mg de poudre.
- Imprégner par 1 ml NH_4OH off. au 1/2 pendant 15 minutes.
- I extraction de 1 heure à l'agitateur magnétique avec 50 ml de méthanol.
- Centrifuger.
- 2 extractions de 20 minutes avec 50 ml de méthanol.
- Réunir les solutions obtenues après centrifugation réalisée dès la fin de la 3ème extraction, et évaporer à sec les 3 extraits à une température $\ll 40°C$.
- Reprendre l'extrait sec par 3 x 25 ml HCl à 2 %.
- Dépigmenter et dégraisser par 3 x 30 ml Hexane.
- Reprendre 60 ml de l'extrait chlorhydrique (= 80 mg de poudre).

- Alcaliniser la liqueur jusqu'à pH > 10 par NH4OH.
  (2 ml NH4OH off. pour 60 ml HCl 2%).
- Extraire les alcaloïdes par 3 x 50 ml CHCL3.
- Evaporer à sec à température $\ll 40°C$.
- Reprendre par 5 ml de tampon acétate de sodium pH 4,7 en grattant le ballon avec un-- agitateur recourbé.
- Prélever 3 ml de la solution tamponnée à pH 4,7 de l'extrait (= 48 mg de poudre).
- Evaporer à sec.

Cette technique d'extraction, inspirée des méthodes de FARNSWORTH (1962) et de HAJKOVA (1961), conçue et mise au point au laboratoire se rapproche d'un principe d'extraction publié par G. FAUGERAS et R. PARIS (FAUGERAS 1965).

Des vérifications ont montré qu'une poudre épuisée, puis extraite à nouveau ne contenait plus d'alcaloïdes, qu'une quantité connue d'alcaloïdes totaux du Rauwolfia serpentina ajoutée à une quantité connue de poudre se retrouvait extraite quantitativement, et que les acides aminés n'étaient pas extraits et ne réagissaient pas selon la réaction du dosage ultérieur.

Des essais réalisés sur les alcaloïdes totaux du Rauwolfia serpentina titrés à 25% de réserpine --- (Merck) ont montré que le meilleur solvant était le-- méthanol, puis à un degré moindre, le chloroforme.

Le benzène et les mélanges chloroforme-éther (I : I) et (I : 3) ne dissolvant qu'une partie plus- ou moins faible des alcaloïdes totaux.

Enfin des essais réalisés selon 2 principes- d'extraction par le méthanol en milieu alcalin, puis passage en milieu aqueux acide était meilleure que-- par l'acide sulfurique ou chlorhydrique au 1/10, puis passage en milieu éther-chloroforme (3 : I) alcalin.

2. SEPARATION DE GROUPES D'ALCALOIDES PAR CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR COUCHE MINCE :

On reprend l'extrait sec par 40 µl de métha-- nol, et on le dépose sur une plaque de silicagel. (Activation à 105°C pendant 30 min, épaisseur 0,25mm).

On rince le tube avec 20 µl de méthanol que-- l'on dépose sur la plaque.

La chromatographie est réalisée en première-- dimension pendant une heure dans le mélange chlorofor me-méthanol (90 : 10), puis en seconde dimension pendant une heure dans le mélange chloroforme-méthanol-- (95 : 5), à la température du laboratoire (20° ± 2°C).

Cette technique est directement inspirée de-- celle de FARNSWORTH (1962) qui a choisi ce système de solvants après de nombreux essais. D'autres systèmes- de solvants pourraient également être employés tels- que le mélange benzène-butanol-acide formique- tampon de Mc Ilvain à pH 3,5 (25 : 5 : I : 3I) (BAUEROVA 1961) ou le mélange Acétate d'éthyle-éthanol absolu-- (3 : I) (INAGAKI : 1964, HARRIS 1964), ou encore les- systèmes acétate d'éthyle-hexane (80 : 20), isobuta-- nol - acide chlorhydrique-eau (7 : I : 2), Benzène - acétate d'éthyle en différentes proportions (PLAT 1963), ou encore le benzène, le chloroforme, l'acétate d'é-- thyle, à l'état pur ou mélangés en proportion varia-- ble à l'éthanol absolu (CONE 1963).

Les alcaloïdes de référence sont l'Akuammine, la Vincamine, la Vincamajine, la Vincamédine, et la Réserpine.

(Nous remercions très vivement ici Monsieur le Professeur PARIS et Monsieur le Professeur LE MEN qui ont bien voulu nous procurer la majeure partie de ces substances).

L'étude des plaques sous rayonnement ultra-violet nous a permis d'observer de très nombreuses zones fluorescentes, même pour une solution de réserpine pure (Merck). Une seule de ces zones a été révélée par le réactif de DRAGENDORFF ; c'est sur cette tache que nous avons mesuré le Rf de la réserpine.

Nous n'avons donc tenu compte que des taches révélées par le réactif de DRAGENDORFF pour analyser qualitativement la répartition des alcaloïdes sur les chromatogrammes.

Le réactif de DRAGENDORFF utilisé pour la pulvérisation des plaques est le réactif modifié selon MUNIER et MACHEBOEUF :

Solution A : S/nitrate de Bi..... 17 g
Acide tatrique.....200 g
Eau distillée.....800 ml

Solution B : Iodure de potassium.....160 g
Eau distillée.....400 ml

} aa solution-mère

Solution diluée (révélateur) :

Solution mère..... 50 ml
Eau distillée.....500 ml
Acide tartrique.....100 g

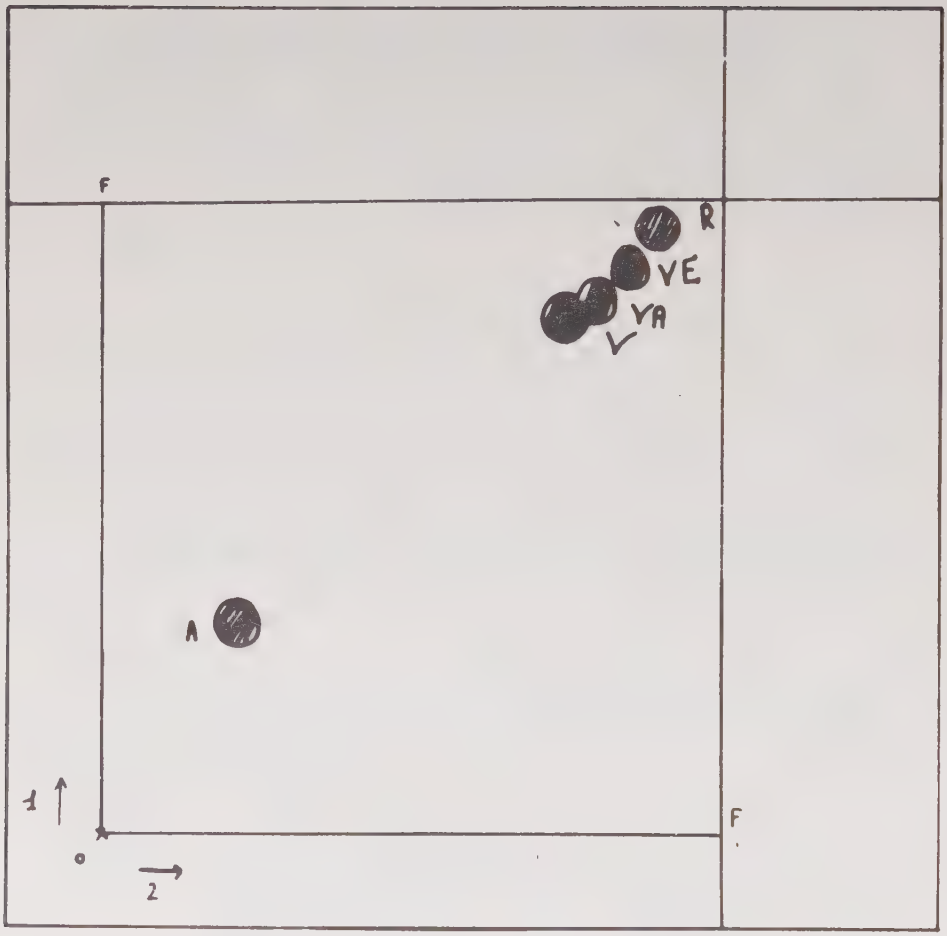
Les résultats des analyses des alcaloïdes témoins sont représentés par le chromatogramme suivant qui résume une vingtaine d'essais réalisés avec chacun des alcaloïdes, ou avec plusieurs alcaloïdes étalons, ou encore avec des mélanges d'extraits végétaux et d'alcaloïdes témoins.

B) APPLICATIONS AUX VINCA :

I. SEPARATION DES GROUPES D'ALCALOIDES, DANS LES FEUILLES, LES TIGES, LES RACINES ET LES FLEURS DU *VINCA MINOR*, DU *VINCA MAJOR* ET DU *VINCA MEDIA*.

Les expériences ont été réalisées surtout sur les poudres des récoltes de 1966 et 1967 ; les résultats des analyses des alcaloïdes sont représentés par les 12 chromatogrammes suivants qui constituent un résumé de toutes nos expériences. Certaines de ces photographies (racines et fleurs) ne correspondent qu'à cinq ou dix expériences, mais les chromatogrammes des feuilles et des tiges sont le calque des résultats de vingt à trente expériences.

Il faut remarquer ici que la séparation et la caractérisation de chaque alcaloïde des Pervenches indigènes n'était pas le but de notre travail ; Nous n'avons donc pas mis au point une technique de chromatographie sur colonne et nous avons seulement utilisé un procédé de séparation chromatographique en couche mince pour essayer de différencier les variations de quelques groupes d'alcaloïdes des Vinca.



Chromatogramme des alcaloïdes témoins.

A = Akuammine V = Vincamine

VA = Vincamajine VE = Vincamédine

R = Réserpine.

Nous n'avons pas trouvé de grandes variations selon les stades de végétation.

Par contre, selon le Tableau XXI et les chromatogrammes suivants, quelques différences semblent-- exister selon les organes.

Les feuilles contiennent le plus grand nombre d'alcaloïdes et certainement la plus grande quantité. Les alcaloïdes témoins ou de structure voisine (Vincamine, Vincamajine, Vincamédine, Akuamine) semblent-- représentés dans les trois espèces de Vinca.

Par contre, en ce qui concerne les tiges, les racines, les boutons floraux et les fleurs, le *Vinca minor* est sans doute dépourvu de Vincamédine et de réserpine mais ses tiges contiendraient de la Vincamine ou des alcaloïdes du groupe de la Vincamine.

Le *Vinca major* et le *Vinca media* auraient de-- la Vincamédine ou des alcaloïdes analogues dans les-- tiges, les racines, les boutons floraux et les fleurs; la Vincamine, la Vincamajine ou des alcaloïdes du --- même type se retrouveraient dans les boutons floraux- et les fleurs du *Vinca major*, et dans les racines du- *Vinca media*.

D'autre part, les taches numérotées I et 3 ne correspondent à aucun de nos témoins.

2. CONCLUSIONS :

- Selon nos résultats, les feuilles sont très riches en alcaloïdes et il ne nous a pas été possible de déceler des différences selon les espèces. Les --- groupes d'alcaloïdes de l'Akuamine, de la Vincamine,- de la Vincamajine et de la Vincamédine y sont été décelés.

- L'examen des feuilles doit être disjoint de celui des autres organes, tout au moins selon nos expériences, pour essayer d'apporter une contribution à la chimiotaxinomie des Pervenches.

L'étude des alcaloïdes des tiges montre en effet une différence nette entre le *Vinca minor* d'une part et le *Vinca major* et le *Vinca media* d'autre part.

Aucune différence n'apparaît en effet entre le *Vinca major* et le *Vinca media.*

Il en est sensiblement de même, bien qu'à un moindre degré, en ce qui concerne les *racines*, les *boutons floraux*, et les *fleurs ;* En effet quelques différences semblent exister ici entre le *Vinca major* et le *Vinca media, mais dans tous ces organes, le Vinca minor diffère des deux autres Vinca par l'absence du groupe de la Vincamédine.*

Pour obtenir des résultats plus précis il aurait fallu éluer chaque tache séparée par notre solvant et étudier ses constituants d'après plusieurs autres techniques.

JANOT, LE MEN et CARNIER (JANOT 1965) signalent en effet que le *Vinca minor* possède 21 alcaloïdes dont 16 du type aspidospermine et Vincamine et 5 de structure indéterminée, tandis que le *Vinca major* et le *Vinca media* n'en possèdent que 8 dont 6 du type yohimbine et 2 du type aspidospermine et Vincamine.

(Aucune alcaloïde du type ibogaïne n'a été trouvé à l'heure actuelle chez ces trois Pervenches).

En ce qui nous concerne, nous retrouvons cer tains de ces alcaloïdes, précédemment cités, mais -- notre but était d'essayer de déceler des variations- possibles des groupes d'alcaloïdes selon les organes et les espèces de Vinca.

Signalons toutefois qu'en ce qui concerne la quantité d'alcaloïdes présents, l'étude la plus inté ressante semble être celle des feuilles, alors que-- jusqu'à présent ce sont les racines qui ont fait l'ob jet du plus grand nombre de recherches.

TABLEAU XXI

RF MESURES SUR LES CHROMATOGRAMMES
DES ALCALOIDES DES VINCA

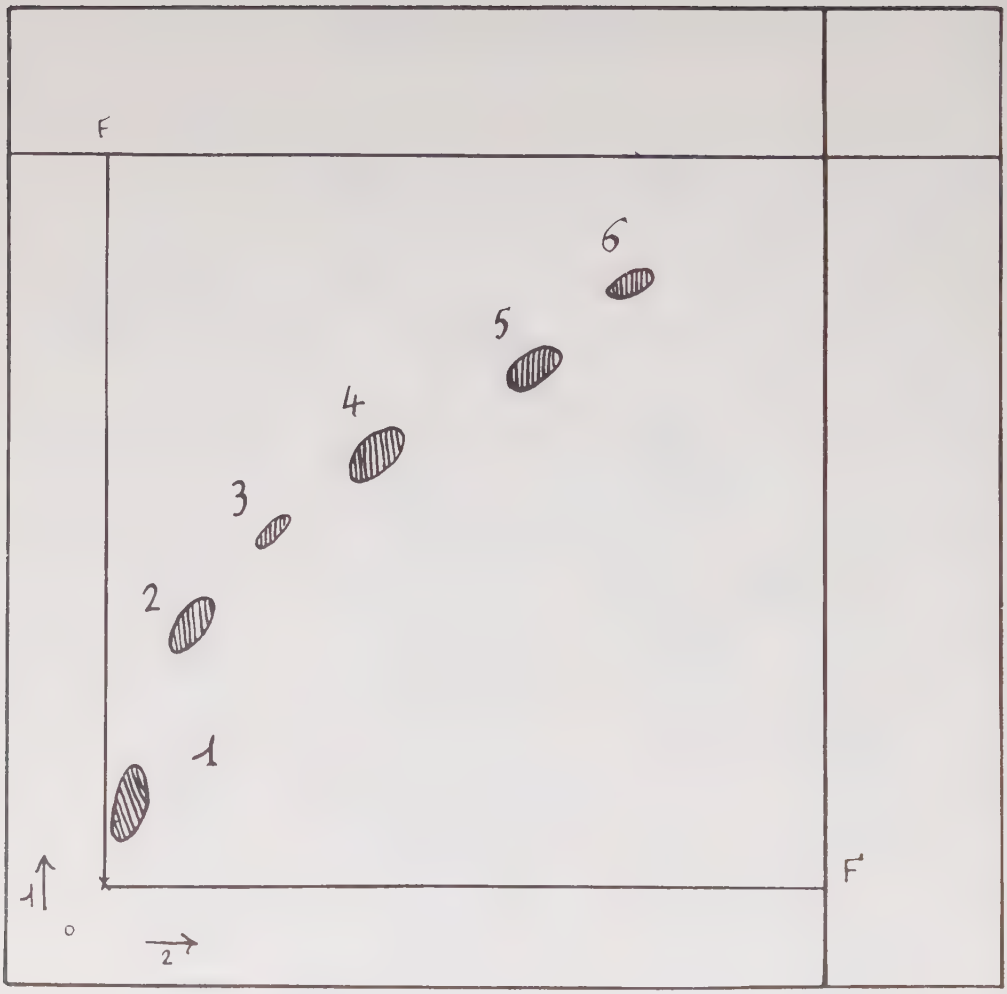
Rf	Alcaloïdes témoins			
	Akuammine (A)	Vincamine (V)	Vincamajine (VA)	Vincamédine (VE)	Réserpine (R)
1 (chloroforme : 90 / méthanol : 10)	0,83	0,79	0,83	0,87	0,94
2 (chloroforme : 95 / méthanol : 5)	0,22	0,74	0,77	0,85	0,87

Rf	numéros des taches des chromatogrammes						espèces et organes des Vinca
	1	2	3	4	5	6	
1: chl.-méth. (90-10)	0,12	0,33		0,55	0,70	0,78	Vinca major (feuilles)
2: chl.-méth. (95-5)	0,03	0,12		0,26	0,53	0,71	
lère dim.	0,11	0,35	0,48	0,58	0,71	0,83	Vinca media (feuilles)
2ème dim.	0,03	0,12	0,22	0,36	0,58	0,72	
lère dim.	0,13	0,30	0,48		0,70	0,80	Vinca minor (feuilles)
2ème dim.	0,04	0,15	0,34		0,62	0,80	
lère dim.	0,10	0,25	0,42			0,89	Vinca major (tiges)
2ème dim.	0,03	0,11	0,25			0,80	
lère dim.	0,12	0,28	0,45			0,80	Vinca media (tiges)
2ème dim.	0,03	0,11	0,23			0,69	
lère dim.	0,10	0,30	0,42	0,56			Vinca minor (tiges)
2ème dim.	0,04	0,17	0,26	0,58			
lère dim.	0,08	0,24	0,39			0,80	Vinca major (racines)
2ème dim.	0,04	0,19	0,37			0,80	
lère dim.	0,13	0,34		0,60		0,87	Vinca media (racines)
2ème dim.	0,04	0,12		0,30		0,60	
lère dim.	0,05	0,16	0,35				Vinca minor (racines)
2ème dim.	0,02	0,10	0,39				
lère dim.	0,11	0,25		0,53	0,69	0,80	Vinca major (boutons floraux et fleurs)
2ème dim.	0,03	0,12		0,30	0,47	0,88	
lère dim.	0,11	0,27		0,54		0,74	Vinca media (boutons floraux et fleurs)
2ème dim.	0,04	0,10		0,34		0,83	
lère dim.	0,12	0,34		0,62			Vinca minor (boutons floraux et fleurs)
2ème dim.	0,02	0,05		0,23			

Chromatogramme des alcaloïdes

des feuilles

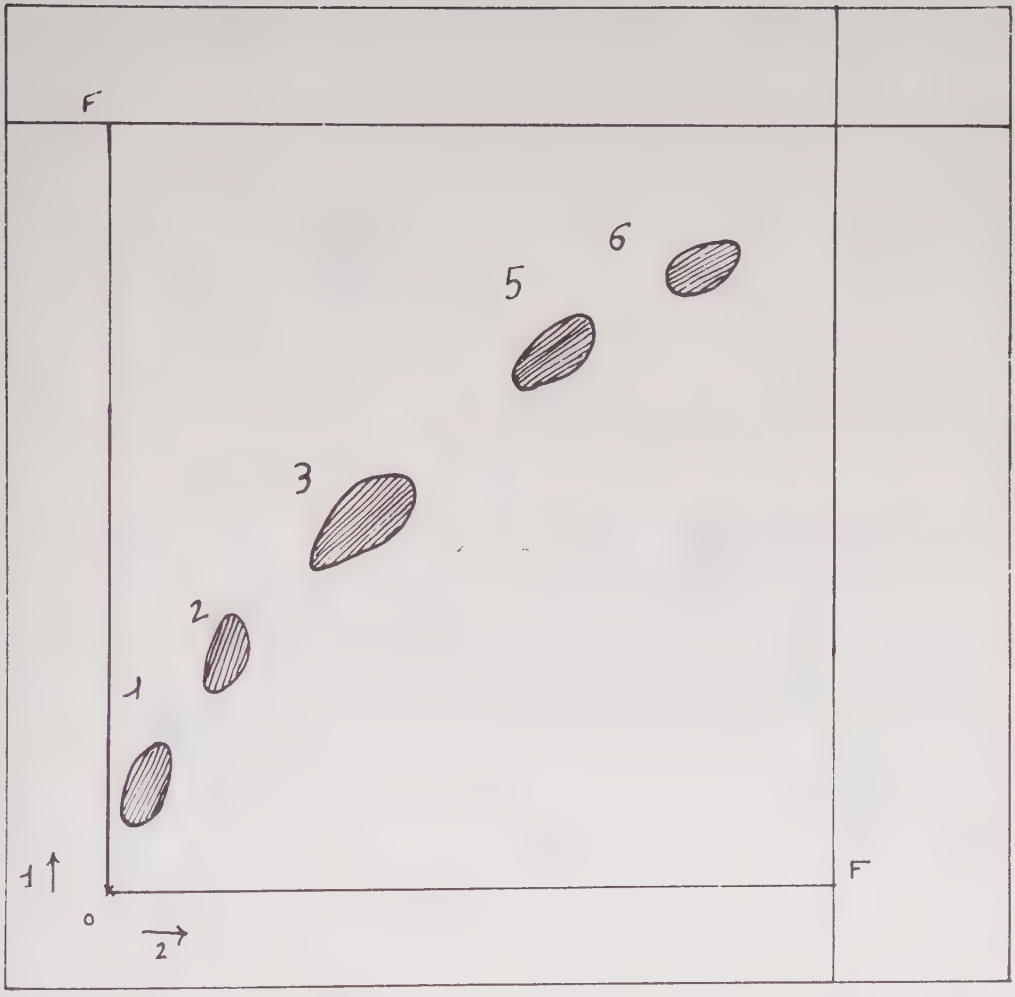
du Vinca major



Chromatogramme des alcaloïdes

des feuilles

du Vinca media



Chromatogramme des alcaloïdes

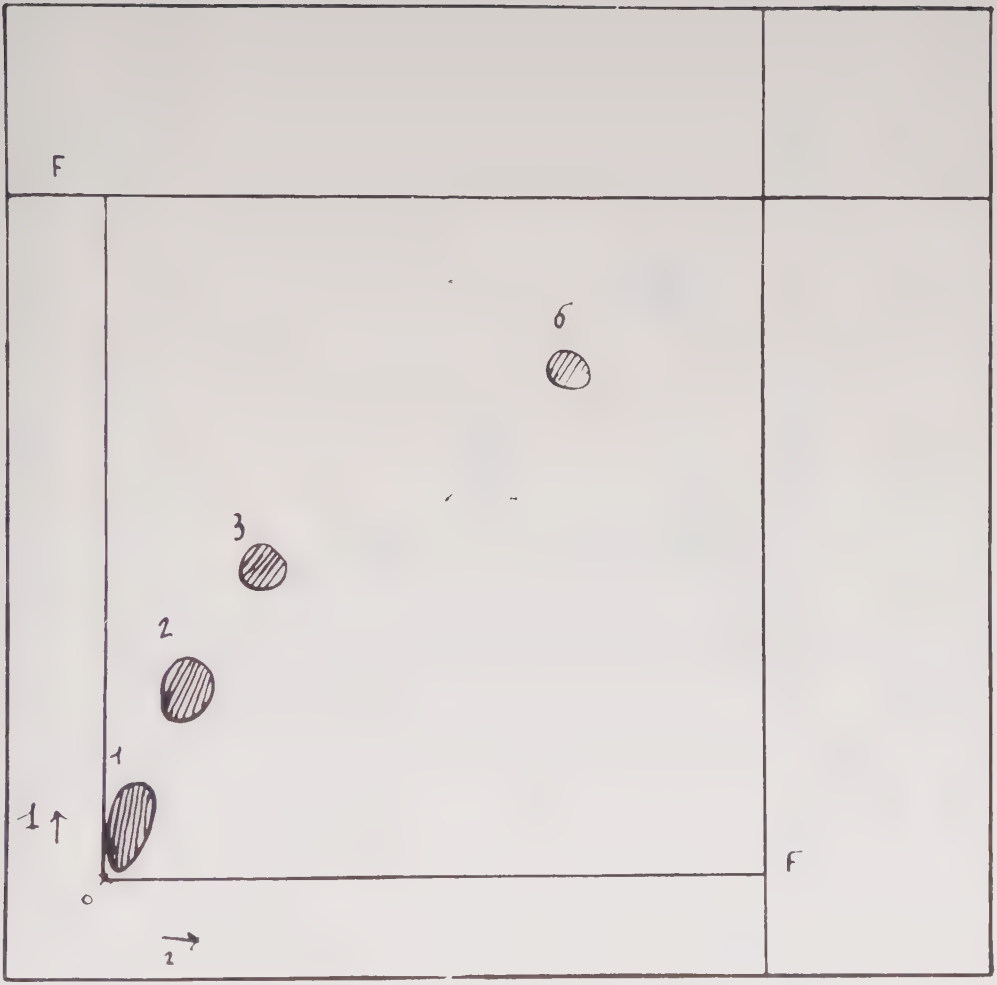
des feuilles

du Vinca minor

Chromatogramme des alcaloïdes

des tiges

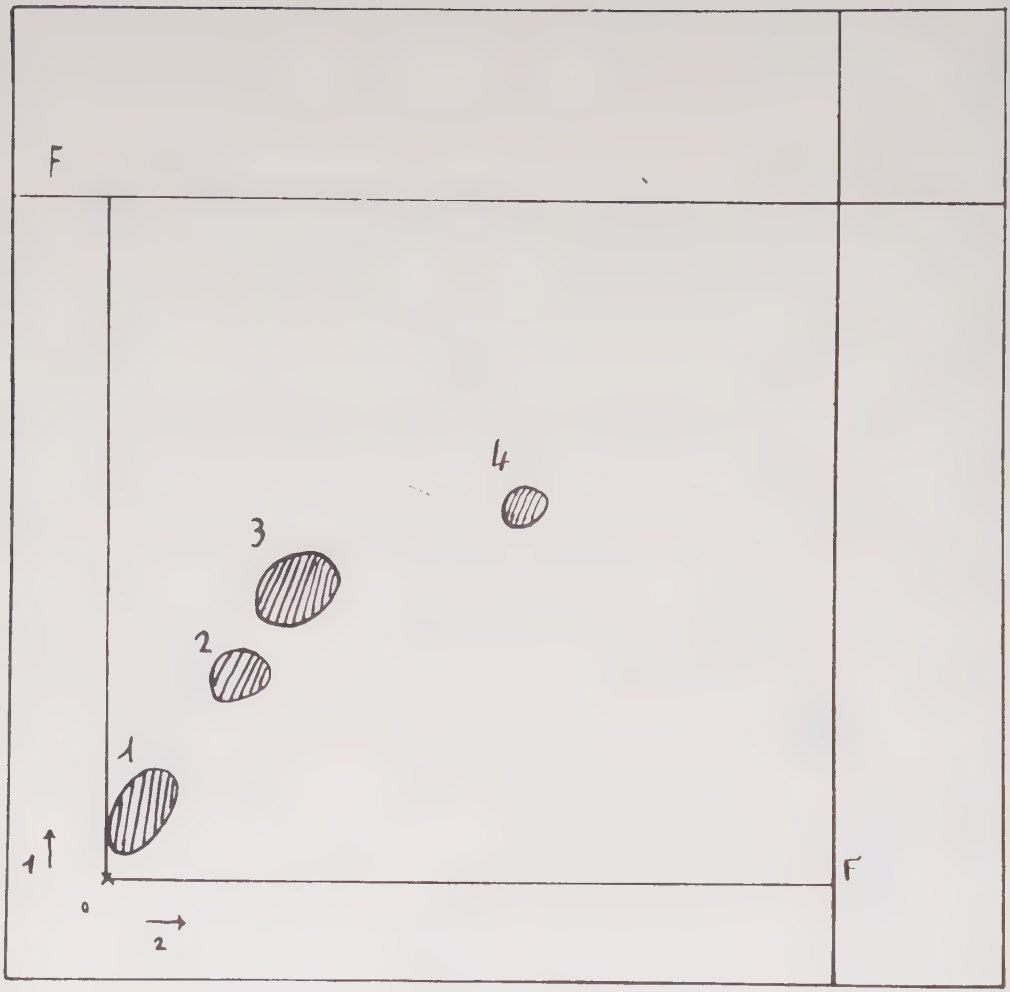
du Vinca major



Chromatogramme des alcaloïdes

des tiges

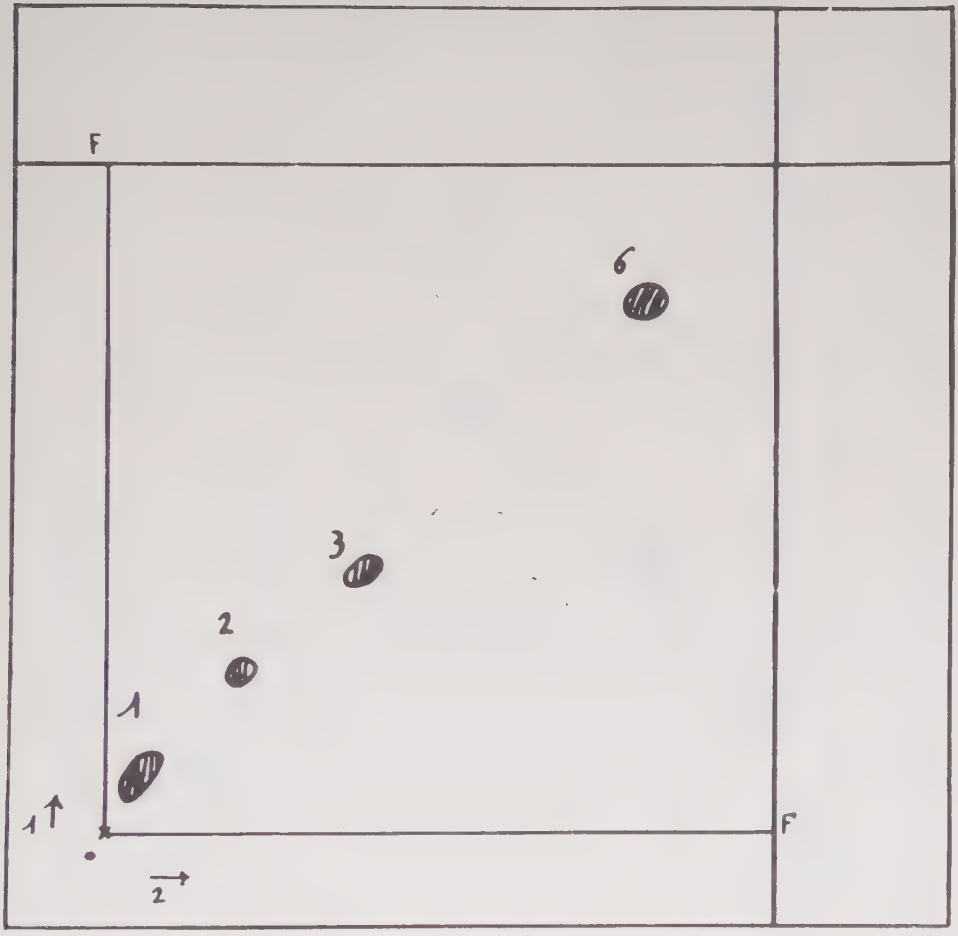
du Vinca media.



Chromatogramme des alcaloïdes

des tiges

du Vinca minor



Chromatogramme des alcaloïdes

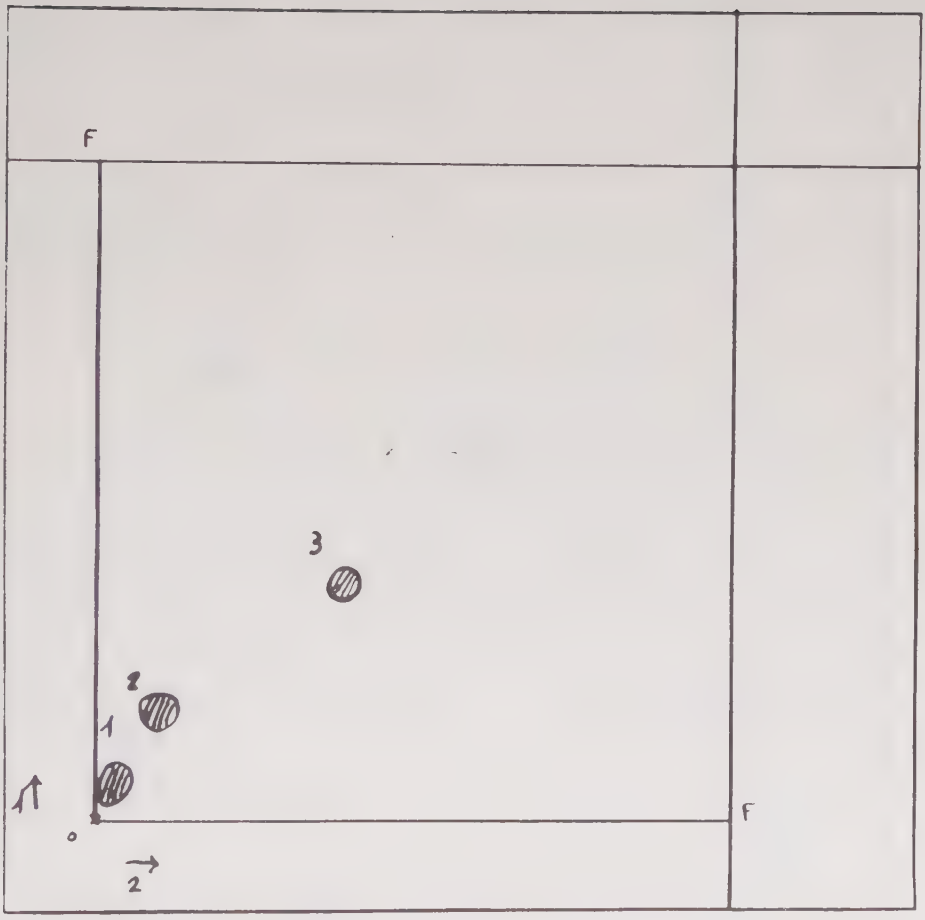
des racines

du Vinca major

Chromatogramme des alcaloïdes

des racines

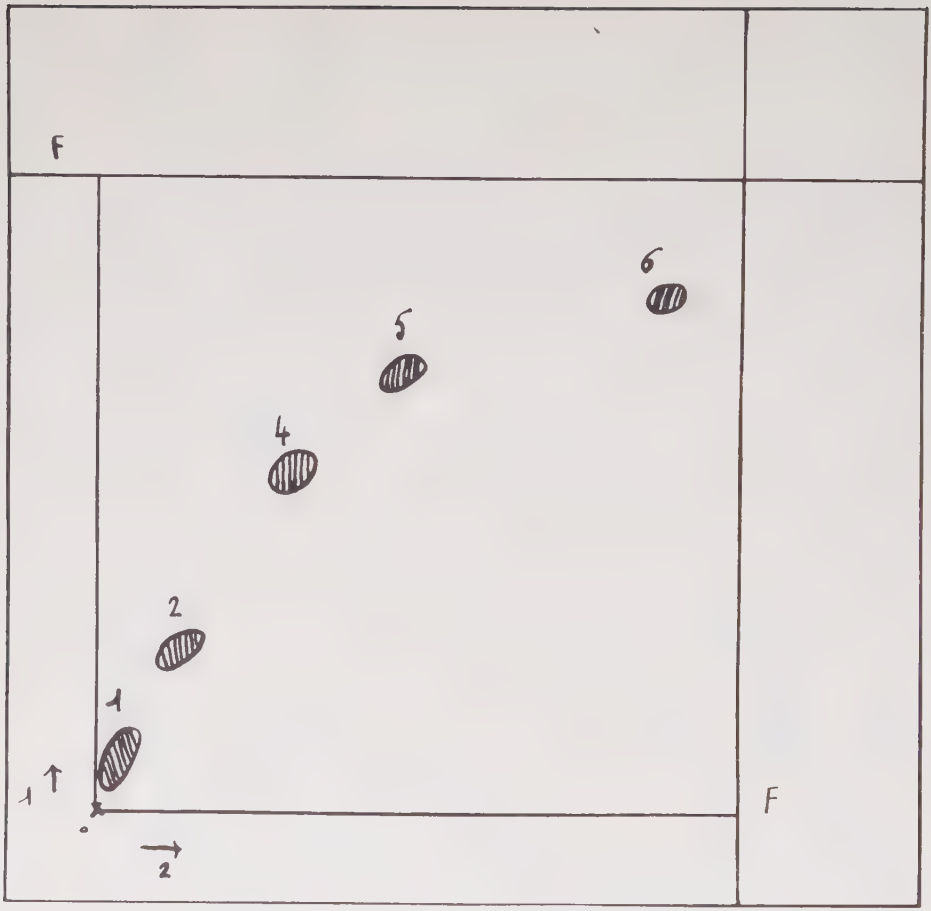
du Vinca media.



Chromatogramme des alcaloïdes

des racines

du Vinca minor

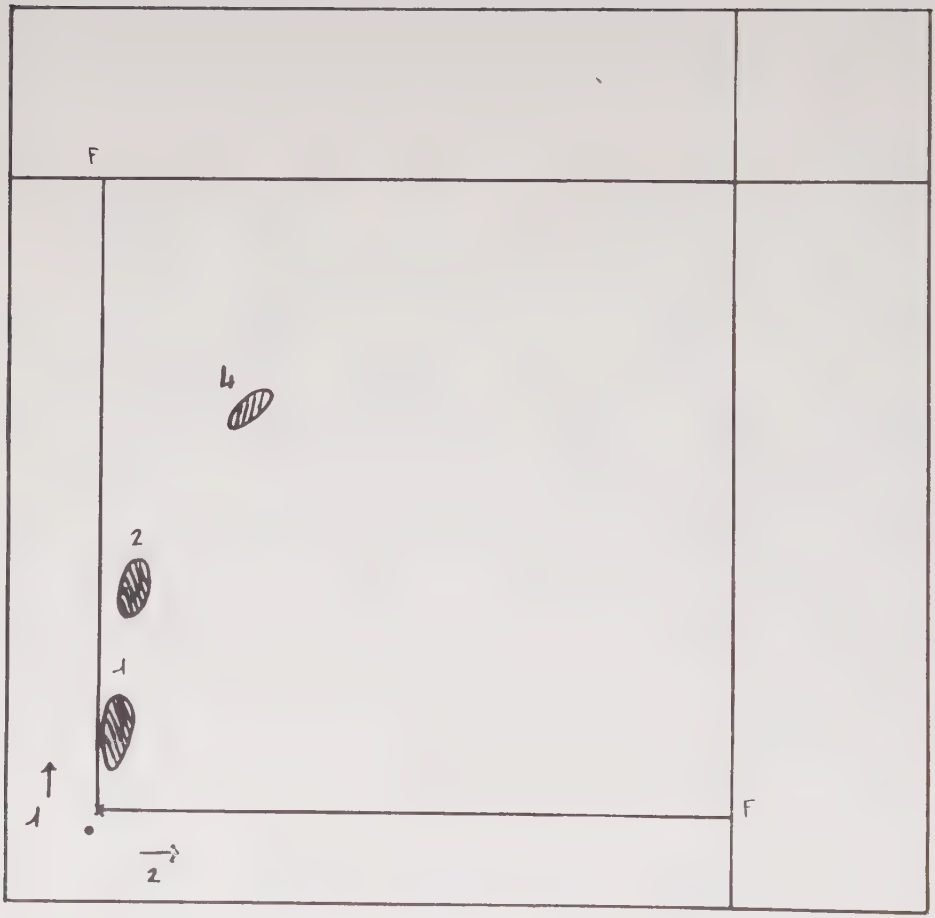


Chromatogramme des alcaloïdes
des boutons floraux et des fleurs
du Vinca major

Chromatogramme des alcaloïdes

des boutons floraux et des fleurs

du Vinca media



Chromatogramme des alcaloïdes
des boutons floraux et des fleurs
du Vinca minor

CHAPITRE II

ETUDE QUANTITATIVE

TRAVAUX ANTERIEURS

M.M. JANOT, J. LE MEN et Madame J. GARNIER rapportent que la molécule de tous les alcaloïdes des Pervenches comprend une partie aromatique où l'on reconnaît l'enchainement de la tryptamine et que des expériences de culture avec des précurseurs marqués ont montré que cette partie aromatique dérive biogénétiquement du tryptophane (JANOT 1965) ; or les résultats précédents ont montré que dans nos prélèvements, s'échelonnant de février à septembre, le tryptophane est à l'état de traces et souvent même absent.

Nous avons donc pensé à étudier les variations quantitatives des alcaloïdes du Vinca minor, du Vinca major et du Vinca media, selon les stades de végétation, en effectuant le dosage des alcaloïdes totaux sur les poudres ayant servi à l'étude des acides-aminés.

Une autre constatation nous a incité à entreprendre cette étude des alcaloïdes.

I. HAJKOVA, V. HOMOLA et leurs collaborateurs de BRNO ont déclaré que les alcaloïdes étaient présents pendant toute la période végétative chez le *Vinca minor* et qu'ils se trouvaient en plus grande quantité dans les racines et en plus faible quantité dans les tiges.

En effectuant des prélèvements de trois mois en trois mois (Novembre 1957 ; février 1958 ; mai 1958 ; août 1958) et en séchant les plantes à la température ordinaire, ils ont trouvé que la quantité d'alcaloïdes était maximale en automne (1,16% : nov. 57) et minimale en hiver (0,56% : fév. 58). (HAJKOVA 1959, 1961, 1962).

P.M. LYAPUNOVA (1964), au contraire, en travaillant sur des prélèvements du *Vinca minor* récoltés en Ukraine, a trouvé que le maximum d'alcaloïdes se trouvait dans la partie aérienne au moment de la floraison (1;35%) et dans les racines au moment de la fructification (1,80%).

Ces deux conclusions semblent contradictoires, mais D.A. BOCHAROVA étudiant d'une manière plus détaillée une autre espèce, le *Vinca herbacea*, rapporte les résultats suivants qui semblent à peu près en accord avec ceux de LYAPUNOVA au sujet du *Vinca minor*.

Dans la partie aérienne de la plante, BOCHAROVA trouve 0,62 à 0,81% d'alcaloïdes quand la Pervenche est en boutons, 0,43 à 0,59% au début de la floraison 0,49 à 0,69% en pleine floraison et 0,33 à 0,40% à la fin de la végétation ; Dans les racines, 1,40 à 1,70% au stade des boutons floraux, 1,84 à 2,33% dans les stades suivants, et 1,29% à la fin de la végétation (BOCHAROVA 1960).

Les conclusions précédentes étant très fluctuantes selon les prélèvements et les techniques, il était évident que la comparaison des variations quantitatives des acides aminés et des alcaloïdes exigeait des extractions et des dosages simultanés sur les mêmes poudres.

Les techniques de dosages des alcaloïdes totaux sont variées. La gravimétrie est actuellement complètement abandonnée et on a utilisé des méthodes de titration en milieu non aqueux au moyen de l'acide para toluène sulfonique en solution dans le chloroforme,-- en présence de jaune diméthylé comme indicateur (JOVA NOVICS 1964, SOBICZEWSKA 1964, SAFARIK 1966).

Toutefois, il a été reconnu que les méthodes volumétriques et néphélométriques n'étaient guère plus souhaitables que les méthodes gravimétriques, et on utilise de plus en plus, à cause de leur sensibilité, les méthodes colorimétriques (KRAMARENKO 1963).

De nombreuses réactions servent ainsi au dosage des alcaloïdes sous forme de complexes colorés (LO--- RINCZ 1961, STEGER 1961, GRAHAM 1961, JAKOVLJEVIC --- 1962, WEYERS 1962) ; citons la réaction à la vanilline en milieu chlorhydrique concentré (MARKIEWICZ 1964),-- la réaction au sulfate d'ammonium et cérium en solution dans l'acide phosphorique (RICHTER 1965, GROEGER 1965) et enfin la réaction à la tropéoline OO (GROEGER 1965, MOHRSCHULZ 1960, LORINCZ 1961, KACZMAREK 1962).

T R A V A U X P E R S O N N E L S

A) CHOIX DES TECHNIQUES.

I. EXTRACTION:

On utilise la méthode mise au point pour l'analyse qualitative.

2. DOSAGES :

Des expériences préliminaires nombreuses furent réalisées pour mettre au point ce dosage.

Le sulfate d'ammonium et de cérium est valable pour les alcaloïdes totaux du *Rauwolfia serpentina* (Merck), mais ce réactif est moins bon pour les extraits du *Vinca major*, la nuance de la couleur rose ou rougeâtre étant variable, et il est même mauvais pour les extraits du *Vinca minor* puisque les couleurs sont très variables et surtout bleuâtres ou verdâtres.

Nous avons également étudié la réaction à l'acide picrique (STAINER 1966). La technique conseille une lecture de la coloration jaune obtenue à 420 nm.

Nous avons fait le spectre de la coloration obtenue, des réactifs et du solvant pour déterminer si le maximum d'absorption étant bien à la longueur d'onde indiquée et s'il n'y avait pas d'interférence dues à la solution chloroformique de l'extrait ou à la solution chloroformique de l'acide picrique.

Les courbes ci-jointes indiquent que le maximum d'absorption n'est pas caractérisé par un pic net et- nous avons abandonné cette méthode, d'autant plus que la chlorophylle présente une absorption maximale à cet te valeur.

Les réactions à la tropéoline 00 nous ont alors intéressé, mais de nombreux échecs dans la mise au--- point nous ont appris qu'il s'agissait d'une méthode- très délicate et nous avons été amenés à codifier --- d'une manière très rigoureuse la technique utilisée-- dans notre laboratoire.

Chaque étape a été contrôlée.

Des essais de solvants et de durée d'imprégna- tion de la poudre par l'ammoniaque furent effectués. Le travail sur des parties aliquotes était obliga--- toire. Nous nous sommes aperçus d'autre part que des erreurs par excès pouvaient se produire si le dichlo rométhane présentait des traces d'eau et si les dosa ges n'étaient pas faits toujours de la même façon,-- d'une manière très rapide et précise, à cause de l'é vaporation du solvant lors des manipulations et des- lectures.

Avant de commencer les dosages, nous avons étu dié les spectres des réactifs et des solvants. Les-- courbes ci-jointes indiquent que le dichlorométhane, l'acide sulfurique en solution méthanolique et la so lution aqueuse saturée de tropéoline 00 ne présentent pas d'absorption à 545 nm, longueur d'onde prescrite pour la lecture de la coloration servant au dosage.- Seule la solution de tropéoline 00 commence à absor- ber à cette longueur d'onde, mais le maximum de l'ab sorption se trouvant à 440 nm, est assez éloigné.

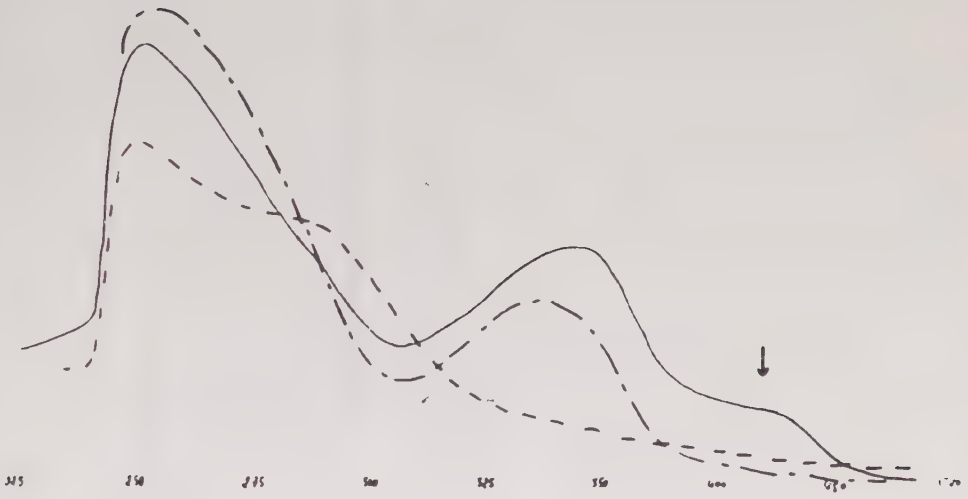
Ensuite, nous avons effectué quelques extrac-- tions et dosages de différents prélèvements du *Vinca minor*, du *Vinca major*, et du *Vinca media*, et nous a- vons soumis les solutions tamponnées des extraits et les colorations obtenues pour le dosage à un enregis

trement spectral au moyen du spectrophotomètre enregis treur Unicam S.P. 800, à double faisceau (il déduit--- donc automatiquement les absorptions des témoins réactifs et solvants, des absorptions du corps étudié).

Chez le *Vinca minor* et le *Vinca major* les prélèvements servant d'exemples sont ceux de Mars, Avril,-- Septembre et Novembre 1966 à 19 H et chez le *Vinca media*, ce sont ceux de Mars, Mai, Juillet et Septembre-- 1966 à 19 H.

Les courbes suivantes obtenues avec les solutions tamponnées des extraits indiquent qu'il n'y a aucune - absorption à 545 nm.

D'autres courbes, obtenues avec les colorations- correspondantes aux extraits précédents indiquent que- chez les 3 Pervenches, l'absorption maximale de la réaction se situe bien à 545 nm.



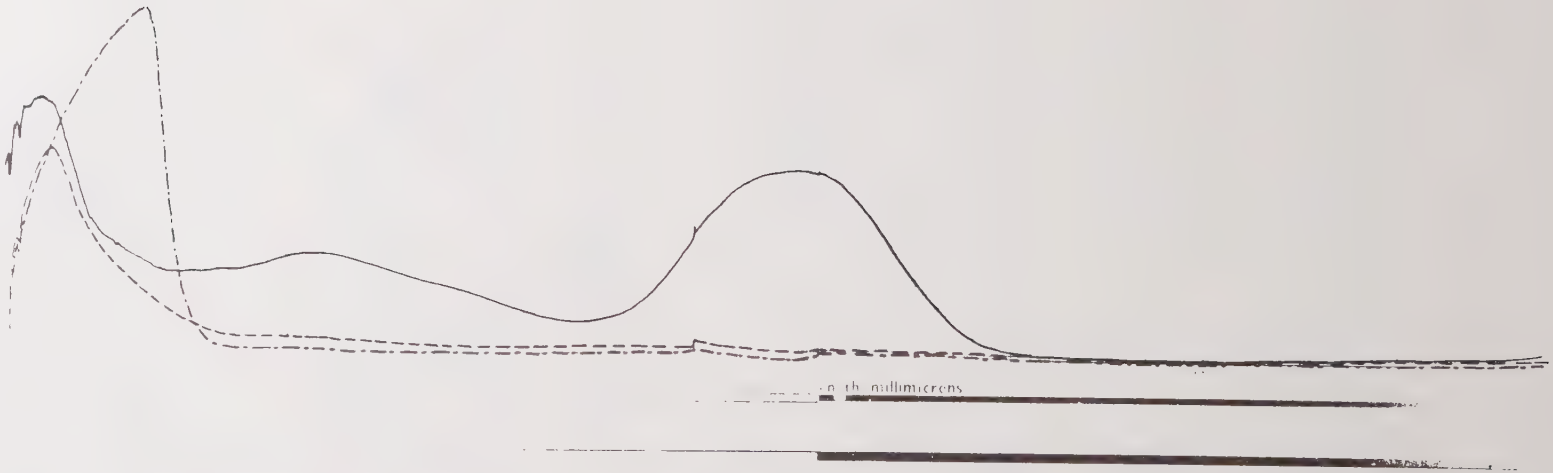
Spectres des réactifs et des solvants utilisés dans la réaction à l'acide picrique.

-.-.-.-.- : Acide picrique à 0,08 % dans le chloroforme. solution diluée au 1/30e.

- - - - - : Extrait dilué au 1/30e dans le chloroforme.

——— : Extrait + acide picrique dilué au 1/30e

Lecture du dosage à 420 nm.



Spectres des réactifs et des solvants utilisés dans la réaction à la Tropéoline 00

——— : Solution aqueuse de Tropéoline 00.

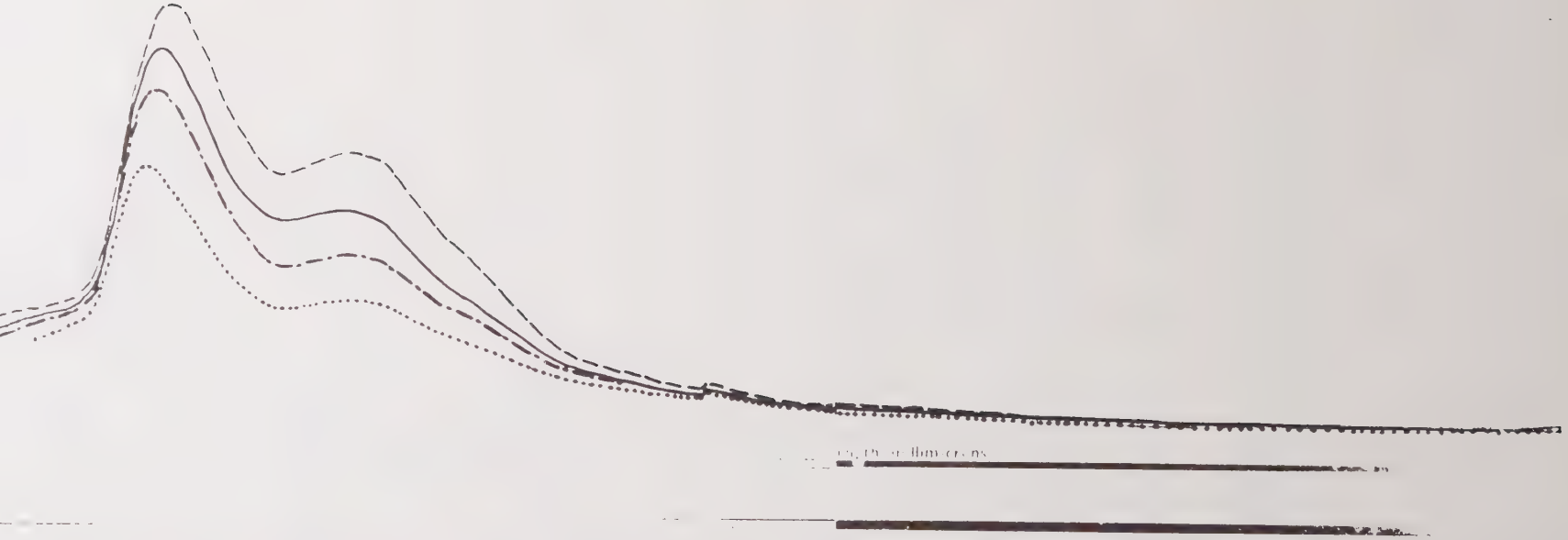
– – – – – : Acide sulfurique en solution à 1% dans le méthanol.

–.–.–.–.– : Dichlorométhane.

Cette réaction des alcaloïdes avec la tropéoline OO est donc intéressante car elle présente un maximum unique à 545 nm, loin de toute absorption parasite.

Nous avons donc utilisé cette technique, codifiée selon les normes suivantes :

- Prélever de façon très précise 1 ml de la solution tamponnée à pH 4,7 de l'extrait réalisé pour l'étude qualitative.
- Ajouter 2 ml de solution aqueuse saturée de tropéoline OO.
- Extraire le complexe en une fois avec 5 ml de dichlorométhane, en bouchant chaque tube et en agitant fortement.
- Centrifuger dans des tubes tronconiques.
- Prélever rapidement et avec précision 2 fois 2 ml.
- Ajouter 1 ml d'acide sulfurique en solution à 1% dans le méthanol.
- Boucher les tubes.
- Diluer la coloration violette obtenue si besoin est. (En principe au 1/50 de l'extrait en ajoutant 9 ml de CH_2Cl_2).
- Boucher les tubes.
- Lire la coloration au spectrophotomètre à 545 nm.
- Comparer avec la gamme étalon en tenant compte des dilutions.



Spectres des extraits de Vinca major L. en solution tamponnée à pH 4,5. (Dilution au 1/3)

———— : Prélèvement de mars 1966.

– – – – – – : Prélèvement d'avril 1966.

—.—.—.—.— : Prélèvement de septembre 1966.

..... : Prélèvement de novembre 1966.

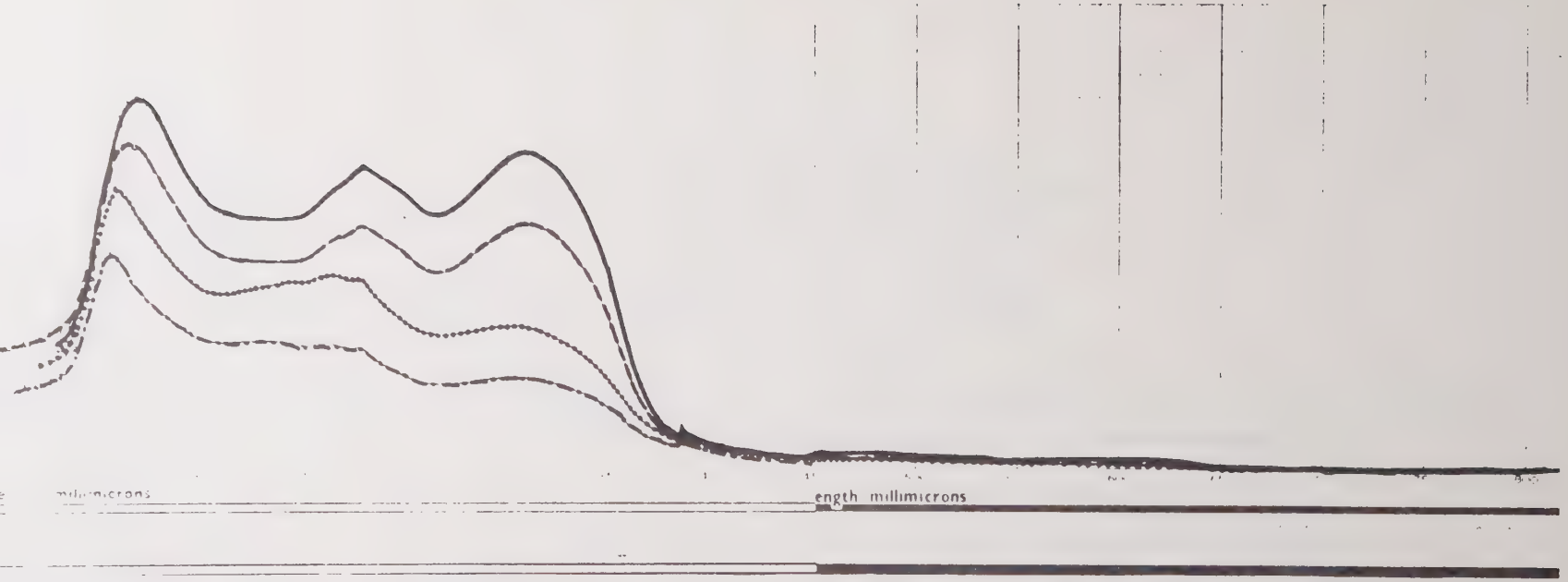
Spectres des extraits de Vinca média Hoffg et Link. en solution tamponnée à pH 4,5 . (dilution au 1/3).

———— : Prélèvement de mars 1966.

– – – – – – : Prélèvement de mai 1966.

—.—.—.—.— : Prelèvement de juillet 1966.

..... : Prélèvement de septembre 1966.



Spectres des extraits de Vinca minor L. en solution tamponnée à pH 4,5 . (Dilution au 1/3).

———— : Prélèvement de mars 1966.

– – – – – : Prélèvement d'avril 1966.

–.–.–.– : Prélèvement de septembre 1966.

..... : Prélèvement de novembre 1966.

Alcaloïdes totaux de Vinca major L. Spectres de la réaction avec la Tropéoline 00.

———— : Prélèvement de mars 1966.

– – – – – : Prélèvement d'avril 1966.

—.—.—.— : Prélèvement de septembre 1966.

..... : Prélèvement de novembre 1966.

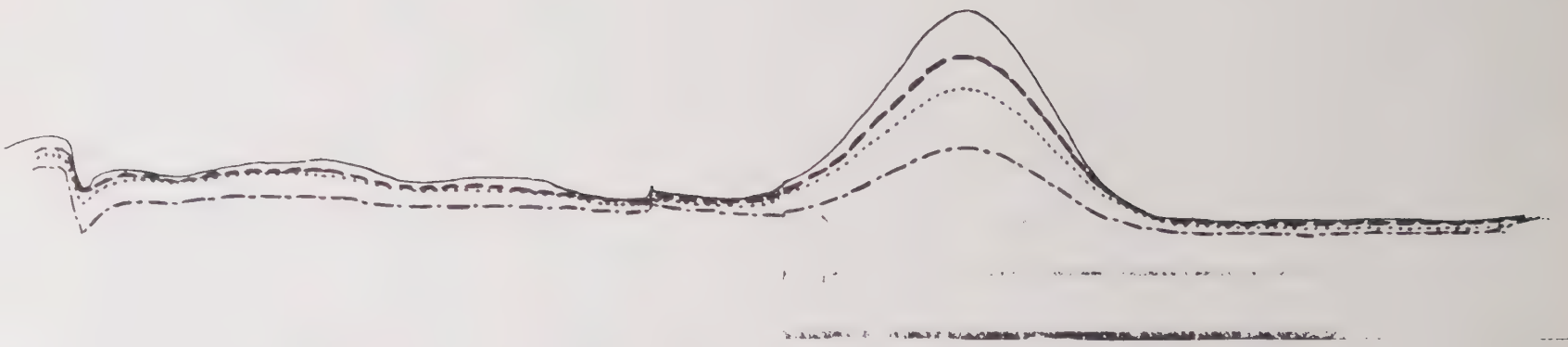
Alcaloïdes totaux de Vinca media Hoff et Link. Spectres de la réaction avec la Tropéoline 00.

———— : Prélèvement de mars 1966.

– – – – – : Prélèvement de mai 1966.

–.–.–.–.– : Prélèvement de Juillet 1966.

..... : Prélèvement de septembre 1966.



Alcaloïdes totaux de Vinca minor L. Spectres de la réaction avec la Tropéoline 00.

———— : Prélèvement de mars 1966.

— — — — — : Prélèvement d'avril 1966.

—.—.—.—.— : Prélèvement de septembre 1966.

..... : Prélèvement de novembre 1966.

B) RESULTATS.

I. DOSAGES DES ALCALOIDES TOTAUX AU COURS DE LA VEGETATION DANS LES FEUILLES, LES TIGES, LES RACINES ET LES FLEURS DU *VINCA MINOR*, DU *VINCA MAJOR* ET DU *VINCA MEDIA* PENDANT LES ANNEES 1964, 1965, 1966 ET 1967.

Nous nous sommes référés, pour évaluer nos résultats, à une courbe étalon obtenue avec quelques milligrammes de Vincamine, extraits et purifiés par Monsieur le Professeur LE MEN.

Les valeurs obtenues, évaluées en mg de Vincamine pour 100 mg de poudre de *Vinca* sont représentées sur les tableaux suivants (Tableaux XXII à XXXI).

- *En ce qui concerne les trois espèces de Vinca étudiées, ces tableaux et les courbes suivantes indiquent que ce sont les feuilles qui renferment la plus grande quantité d'alcaloïdes au cours d'une année.*

L'étude quantitative vérifie ainsi les suppositions émises à l'occasion de l'étude qualitative par chromatographie en couche mince.

Dans des prélèvements du *Vinca major* et du *Vinca minor* réalisés à différents moments de la journée, les alcaloïdes, comme les acides aminés, se trouvent en quantité nettement plus élevée dans la soirée.

Les variations quantitatives des alcaloïdes dans les feuilles semblent présenter trois valeurs-

maximales dans le cas du *Vinca media*, et deux valeurs maximales dans le cas du *Vinca major*, et du *Vinca minor* ; ce sont les valeurs mesurées au moment de la floraison, puis au moment de la fructification.

En 1966 et en 1967, c'est en effet au moment de la floraison, quel que soit le mois correspondant (Février, Mars, ou Avril), que les alcaloïdes sont en concentration maximale dans les feuilles.

- Dans les prélèvements de tiges du *Vinca minor* et du *Vinca major* effectués à différentes heures d'une même journée, la quantité maximale d'alcaloïdes apparaît plus rapidement que dans les feuilles puisqu'elle se situe au milieu de la journée.

D'autre part, les courbes concernant le *Vinca media* signalent que les variations sont reproductibles, dans une certaine mesure, d'une année à l'autre.

Les courbes correspondant aux trois espèces de Vinca pour la même année, 1967, montrent une baisse sensible du taux des alcaloïdes, à la même époque de végétation, soit en Juin et en Octobre, après la floraison et après la fructification.

Mais les variations quantitatives des alcaloïdes dans les tiges, toujours légèrement décalées dans le temps par rapport à celles des feuilles sont beaucoup plus variables, surtout en ce qui concerne le *Vinca minor*, et ne semblent pas devoir présenter autant d'intérêt que celles des feuilles.

- Il en est de même des dosages réalisés sur les quelques prélèvements de racines effectués en 1967 ; ces mesures ne servent qu'à montrer *que contrairement aux opinions habituelles, l'étude des racines de Vinca est beaucoup moins intéressante que celle des feuilles.*

Le fait qu'il s'agit de plantes vivaces explique peut-être ce phénomène.

Toutefois, ce sont les racines qui ont jusqu'à présent fait l'objet du plus grand nombre d'études.

- Quant aux boutons floraux et aux fleurs, si des essais semblent indiquer que la quantité maximale d'alcaloïdes dans les fleurs du *Vinca minor* apparaît au milieu de la journée, *les résultats de tous les dosages montrent que ce sont les boutons-floraux fermés et encore verts qui renferment la-- plus grande quantité d'alcaloïdes.*

En 1966 et en 1967, que ce soit sur le Vinca minor, le Vinca major, ou le Vinca media, la concentration en alcaloïdes décroit des boutons floraux-- fermés verts aux fleurs en train de se faner en passant par les boutons fermés violets, les boutons ou verts violets, les fleurs en train de s'épanouir et les fleurs épanouies.

2. CONCLUSIONS.

- Au point de vue quantitatif, l'étude des-- feuilles est de loin la plus intéressante.

TABLEAU XXII

VINCA MAJOR (FEUILLES)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1966		Année 1967	
						Janv. (19H)	0,56
		Févr. (9H)	0,58			Févr. (9H)	0,41
						Févr. (11H)	0,46
						Févr. (14H)	0,50
						Févr.(16H30)	0,52
		Févr. (19H)	0,43			Févr. (19H)	0,72
				Mars (19H)	0,85	Mars (19H)	0,95
		Avr. (9H)	0,66				
		Avr. (19H)	0,91	Avr. (19H)	0,56	Avr. (19H)	0,41
Mai (19H)	0,56			Mai (19H)	0,23	Mai (19H)	0,32
		Juin (9H)	0,36				
		Juin (19H)	0,75	Juin (19H)	0,64	Juin(19H)	0,31
				Juil. (19H)	0,55	Juil. (19H)	0,83
						Août (19H)	0,91
				Sept. (19H)	0,44	Sept. (19H)	0,70
				Oct. (19H)	0,43	Oct. (19H)	0,35
				Nov. (19H) (jeunes)	0,38	Nov. (19H)	0,35
				(âgées)	0,10		
				Déc. (19H)	0,41	Déc. (19H)	0,42

T A B L E A U X X I I I

VINCA MEDIA (FEUILLES)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

pour 100 mg de poids sec.

Année 196[illegible]		Année 1966		Année 1967	
				Février (19H)	1,28
		Mars (19H)	0,62	Mars (19H)	1,03
				Avril (19H)	0,42
Mai (19H)	0,65	Mai (19H)	0,57	Mai (19H)	0,62
		Juin (19H)	0,96	Juin (19H)	0,70
		Juillet (19H)	0,65	Juillet (19H)	0,62
				Août (19H)	0,52
		Septembre (19H)	0,81	Septembre (19H)	0,71
		Octobre (19H)	0,86	Octobre (19H)	0,38
		Novembre (19H)	0,63	Novembre (19H)	0,37
		Décembre (19H)	0,62	Décembre (19H)	0,71

T A B L E A U X X I V

VINCA MINOR (FEUILLES)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1966		Année 1967	
						Janv. (19H)	0,35
		Févr. (9H)	0,42			Févr. (9H)	0,27
						Févr. (11H)	0,35
						Févr. (14H)	0,54
						Févr.(16H30)	0,5[illegible]
		Févr. (19H)	0,66			Févr. (19H)	0,62
Mars (19H)	0,56			Mars (19H)	1,31	Mars (19H)	0,90
		Avr. (9H)	0,58				
		Avr. (19H)	1,01	Avr. (19H)	0,96	Avr. (19H)	0,5
Mai (19H)	0,58			Mai (19H)	0,68	Mai (19H)	0,5[illegible]
		Juin (9H)	0,67				
		Juin (19H)	0,68	Juin (19H)	0,50	Juin (19H)	0,33
				Juil. (19H)	0,55	Juil. (19H)	0,4[illegible]
						Août (19H)	0,42
				Sept. (19H)	0,43	Sept. (19H)	0,50
				Oct. (19H)	0,60	Oct. (19H)	0,56
				Nov. (19H)	0,43	Nov. (19H)	0,80
				Déc. (19H)	0,35	Déc. (19H)	0,62

T A B L E A U X X V

VINCA MAJOR (TIGES DRESSEES)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

pour 100 g de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1966		Année 1967	
						Janv. (19H)	0,41
		Févr. (9H)	0,58			Févr. (9H)	0,04
						Févr. (11H)	0,03
						Févr. (14H)	0,18
						Févr.(16H30)	0,28
		Févr. (19H)	0,55			Févr. (19H)	0,13
				Mars (19H)	0,59	Mars (19H)	0,40
		Avr. (9H)	0,43				
		Avr. (19H)	0,57	Avr. (19H)	0,59	Avr. (19H)	0,42
Mai (19H)	0,45					Mai (19H)	0,60
		Juin (9H)	0,51				
		Juin (19H)	0,61	Juin (19H)	0,50	Juin (19H)	0,31
				Juil. (19H)	0,56	Juil. (19H)	0,55
						Août (19H)	0,47
				Sept. (19H)	0,57	Sept. (19H)	0,23
				Oct. (19H)	0,22	Oct. (19H)	0,25
				Nov. (19H) (jeunes)	0,68	Nov. (19H)	0,41
				(âgées)	0,61		
				Déc. (19H)	0,53	Déc. (19H)	0,15

T A B L E A U X X V I

VINCA MEDIA (TIGES D'ESSAIS)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1966		Année 1967	
				Févr. (19H)	0,32
		Mars (19H)	0,57	Mars (19H)	0,32
				Avr. (19H)	0,33
Mai (19H)	0,41	Mai (19H)	0,70	Mai (19H)	0,42
		Juin (19H)	0,56	Juin (19H)	0,12
		Juil. (19H)	0,77	Juil. (19H)	0,56
				Août (19H)	0,68
		Sept. (19H)	0,65	Sept. (19H)	0,56
		Oct. (19H)	0,68	Oct. (19H)	0,40
		Nov. (19H)	0,56	Nov. (19H)	0,45
		Déc. (19H)	0,43	Déc. (19H)	0,25

TABLEAU XXVII

VINCA MINOR (TIGES [illegible])

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincanine,

pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1966		Année 1967	
						Janv. (19H)	0,34
		Févr. (9H)	0,23			Févr. (9H)	0,34
						Févr. (11H)	0,37
						Févr. (14H)	0,50
						Févr. (16H30)	0,37
		Févr. (19H)	0,20			Févr. (19H)	0,37
Mars (19H)	0,25			Mars (19H)	0,31	Mars (19H)	0,39
		Avr. (9H)	0,47				
		Avr. (19H)	0,62	Avr. (19H)	0,28	Avr. (19H)	0,42
Mai (19H)				Mai (19H)	0,41	Mai (19H)	0,39
		Juin (9H)	0,37				
		Juin (19H)	0,39	Juin (19H)	0,25	Juin (19H)	0,22
				Juil. (19H)	0,25	Juil. (19H)	0,46
						Août (19H)	0,25
				Sept. (19H)	0,43	Sept. (19H)	0,46
				Oct. (19H)	0,41	Oct. (19H)	0,37
				Nov. (19H)	0,34	Nov. (19H)	0,43

T A B L E A U X X V I I I

VINCA (RACINES)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine, pour 100 mg de poids sec.

	Vinca minor	Vinca major	Vinca media
Juin 1967 (19h)	0,15	0,28	0,70
Septembre 1967 (19h)	0,25	0,37	0,71
Octobre 1967 (19h)	0,45	0,06	0,42
Novembre 1967 (19h)	0,16	0,55	0,68
Décembre 1967 (19h)	0,50		0,08

T A B L E A U X X I X

VINCA MAJOR

(Boutons floraux, fleurs, fruits)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

pour 100 mg de poids sec.

Année 1966		Année 1967	
Mars-Avril 19 h			
Boutons verts	0,18	Boutons verts (Février-Mars 19h)	0,25
Boutons fermés violets	0,12	Boutons violets (Mars-Avril-Mai 19 h)	0,18
Boutons ouverts violets	0,16		
Fleurs en train de s'épanouir	0,11	Fleurs (Avril-Mai 19 h)	0,12
Fleurs épanouies	0,16		
Fleurs en train de se faner	0,14		
		Fruits (Mai 19 h)	0,37

T A B L E A U X X X

VINCA MEDIA

(Boutons floraux, fleurs, fruits)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine, pour 100 mg de poids sec.

A N N E E I 9 6 7	
Boutons fermés encore verts (Mars-Avril 19h)	0,26
Boutons violets (Avril-Mai 19h)	0,18
Fleurs (Mai 19h)	0,12
Fruits (Juin 19h)	0,14

T A B L E A U X X X I

VINCA MINOR

(Boutons floraux, fleurs, fruits)

milligrammes d'alcaloïdes totaux, évalués en vincamine,

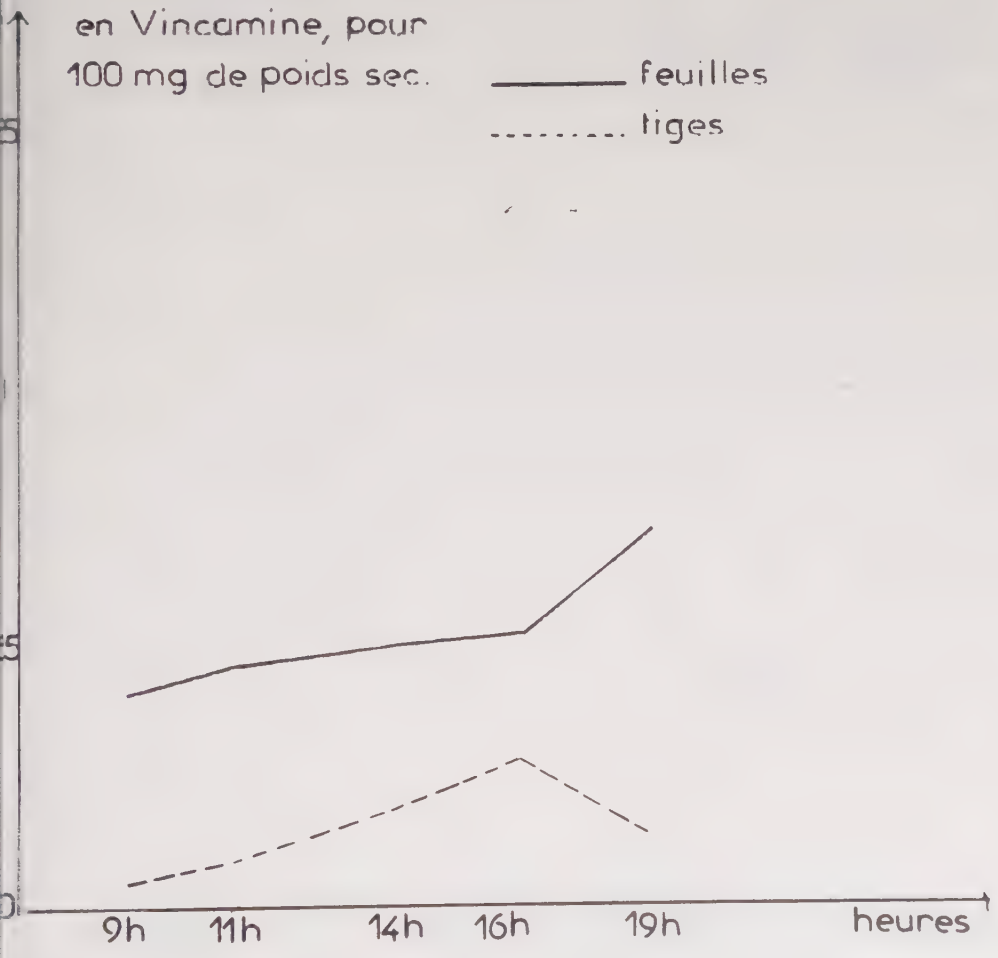
pour 100 mg de poids sec.

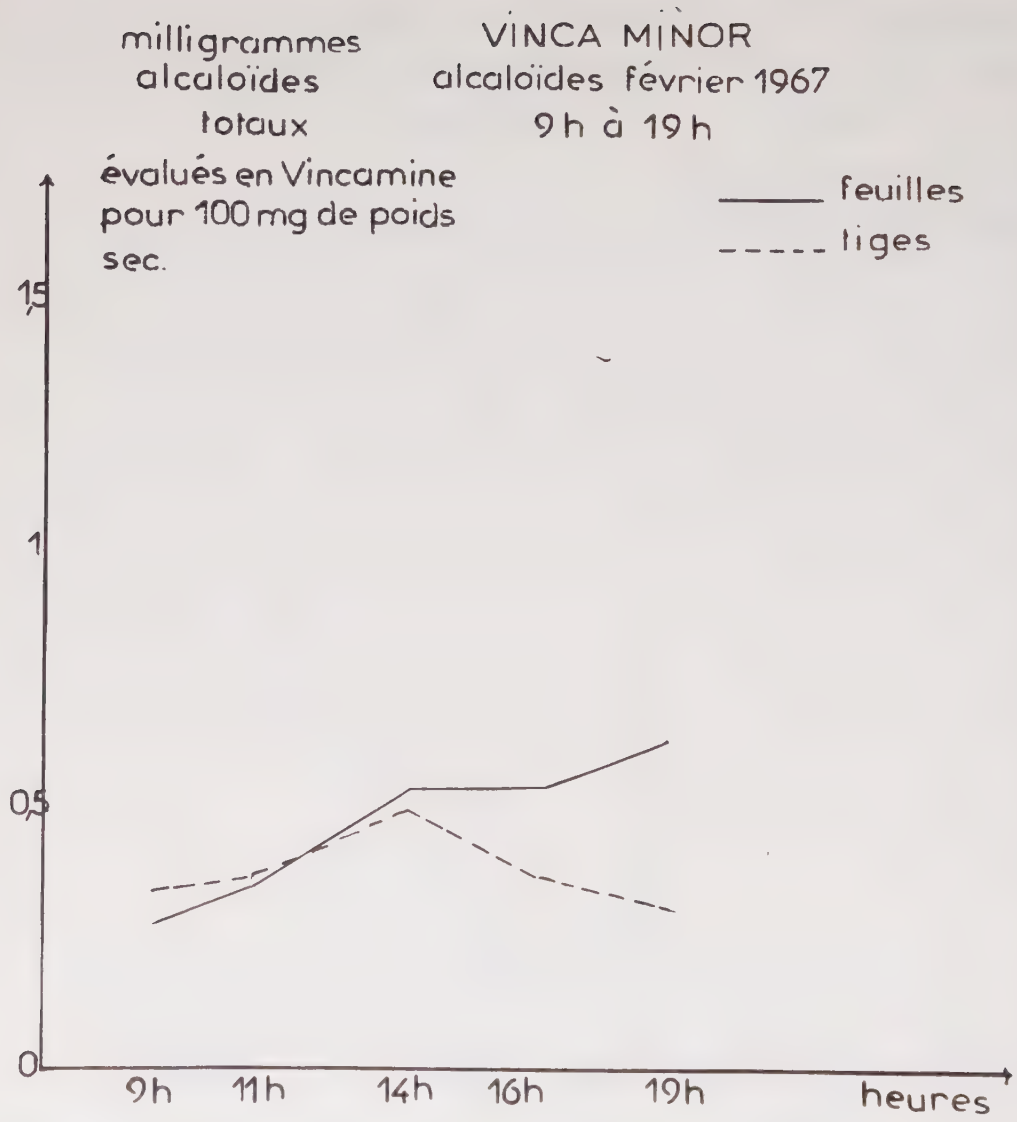
Année 1965		Année 1966		Année 1967	
Avril		Mars-Avril 19 h		Février-Mars 19 h	
Boutons (9 h)	0,12	Boutons fermés encore verts	0,56		
		Boutons fermés violets	0,35	Boutons violets	0,18
		Boutons ouverts violets	0,31		
Fleurs 9 h	0,16				
Fleurs 16 h	0,48				
Fleurs 19 h	0,27				
		Fleurs en train de s'épanouir	0,28		
		Fleurs épanouies	0,25	Fleurs	0,14
		Fleurs en train de se faner	0,22		
Fruits : 1 seul fruit récolté en 4 années.					

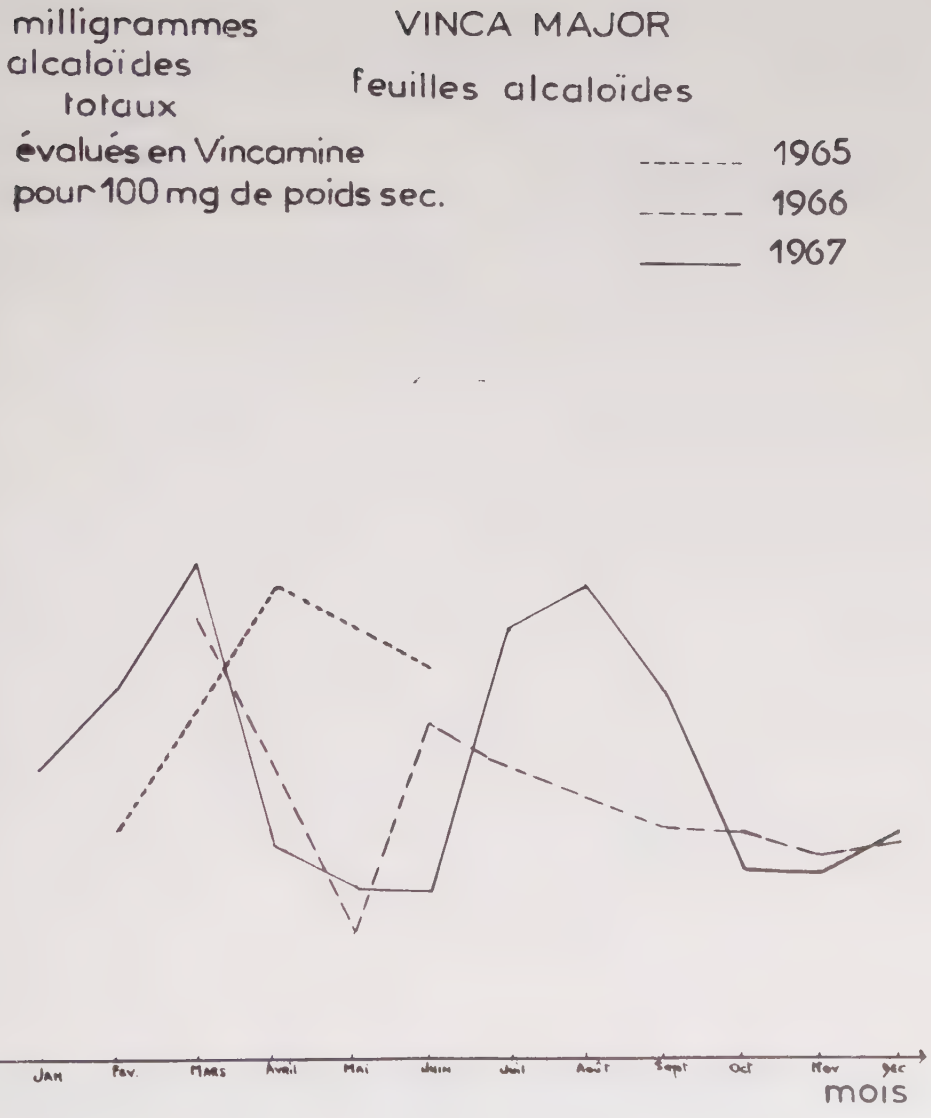
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine, pour 100 mg de poids sec.

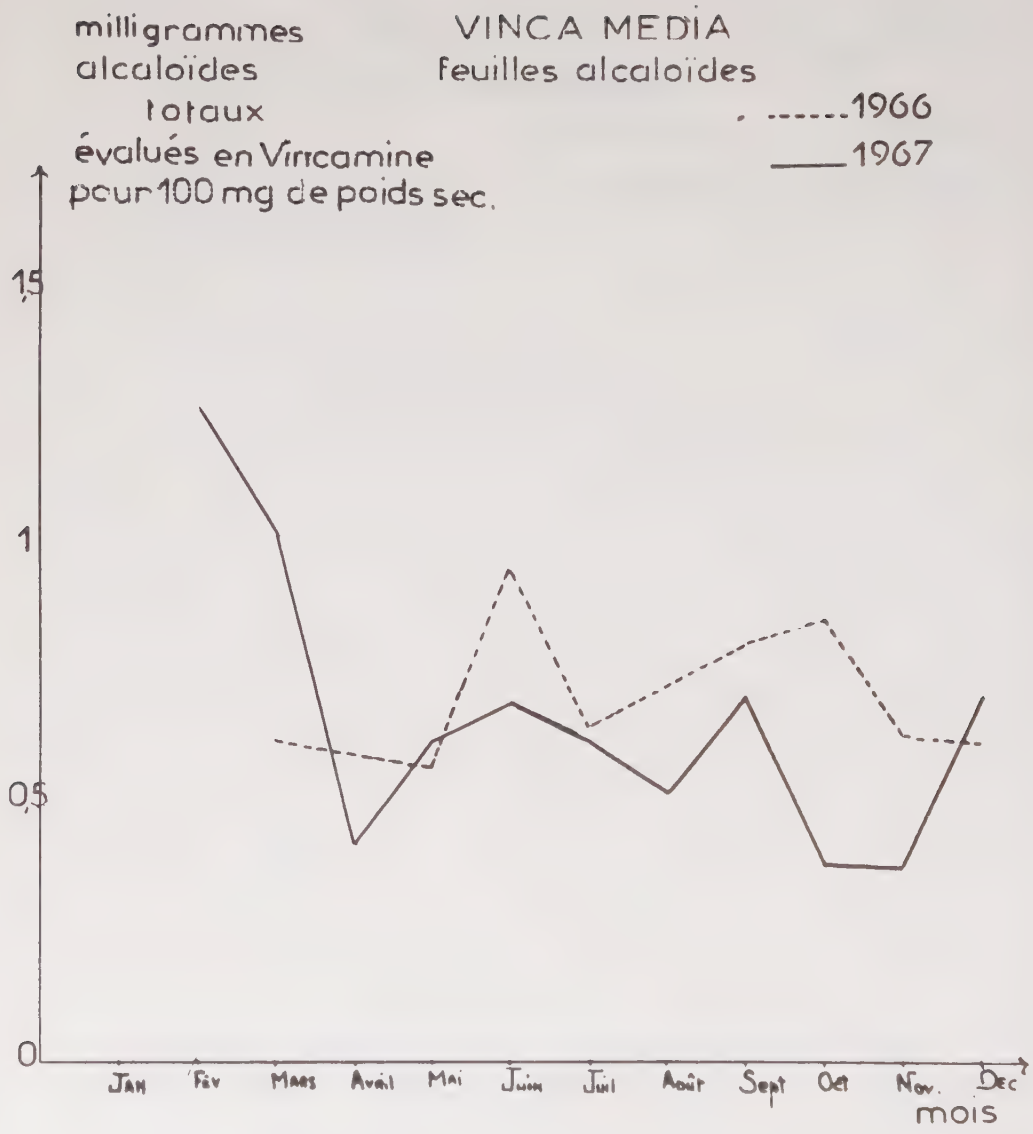
VINCA MAJOR
alcaloïdes février 1967
9h à 19h

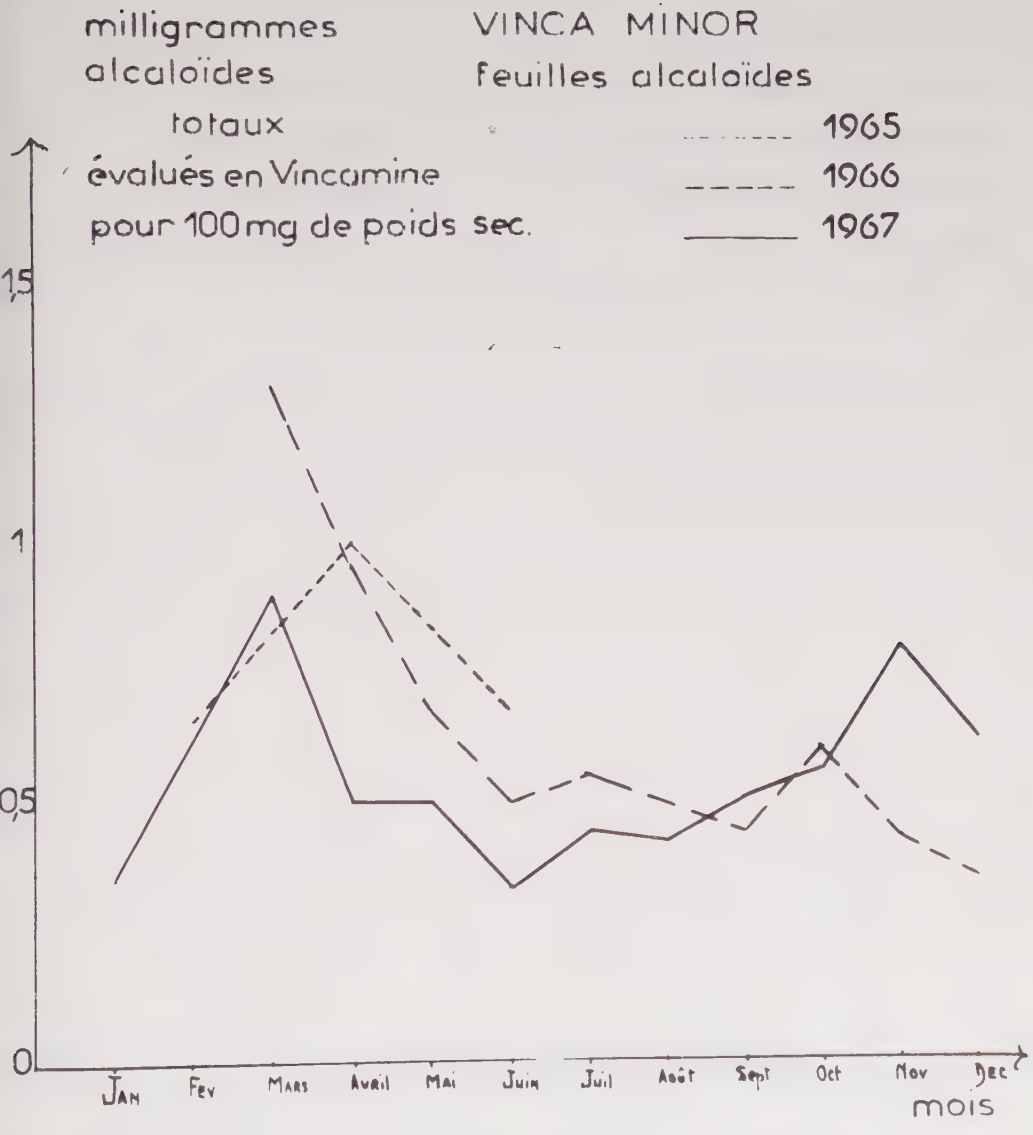
——— feuilles
..... tiges




milligrammes
alcaloïdes
totaux
évalués en Vincamine
pour 100 mg de poids
sec.
VINCA MINOR
alcaloïdes février 1967
9 h à 19 h
feuilles
tiges
1,5
1
0,5
0
9h
11h
14h
16h
19h
heures

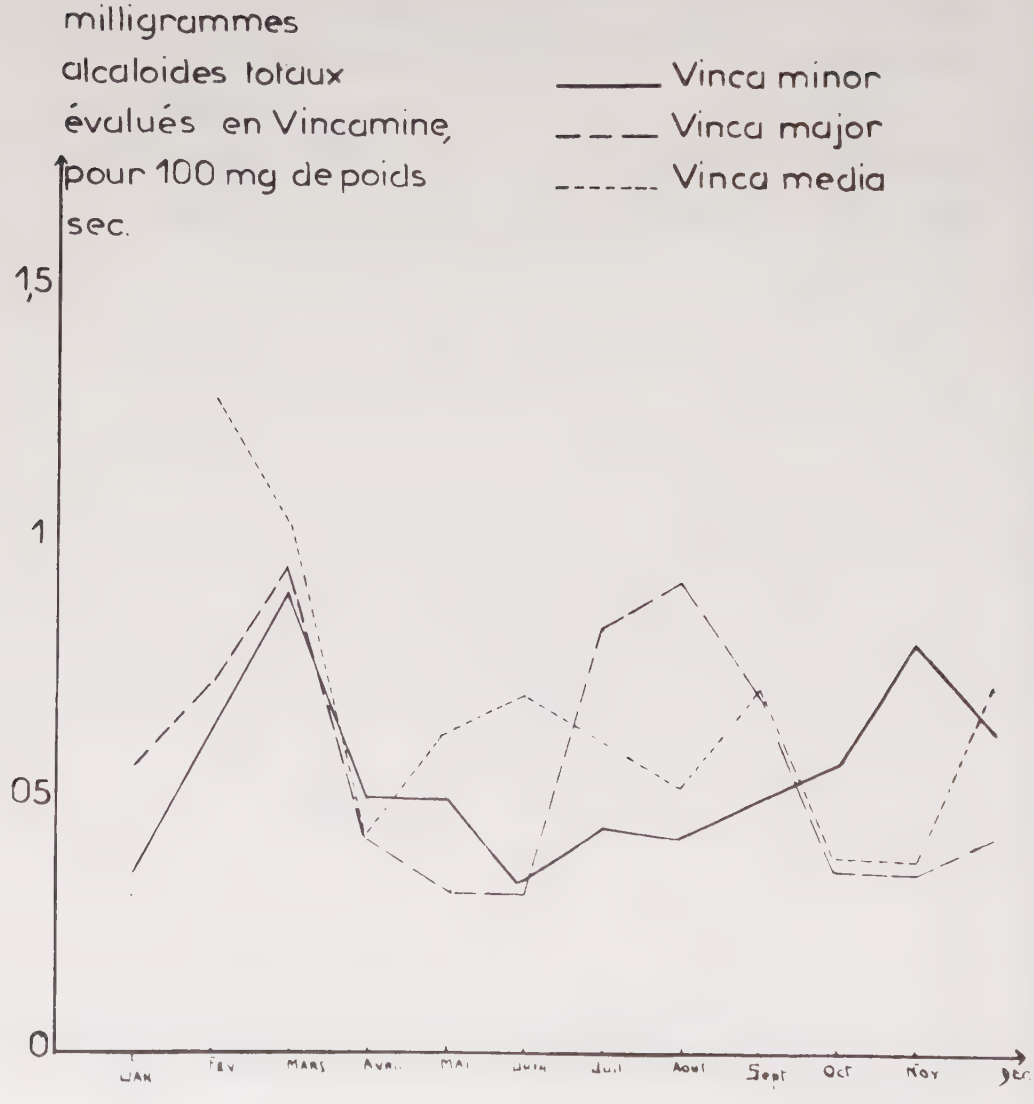

milligrammes
alcaloïdes
totaux
évalués en Vincamine
pour 100 mg de poids sec.
VINCA MAJOR
feuilles alcaloïdes
1965
1966
1967
1,5
1
0,5
0
JAN
Fév.
MARS
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Déc
mois

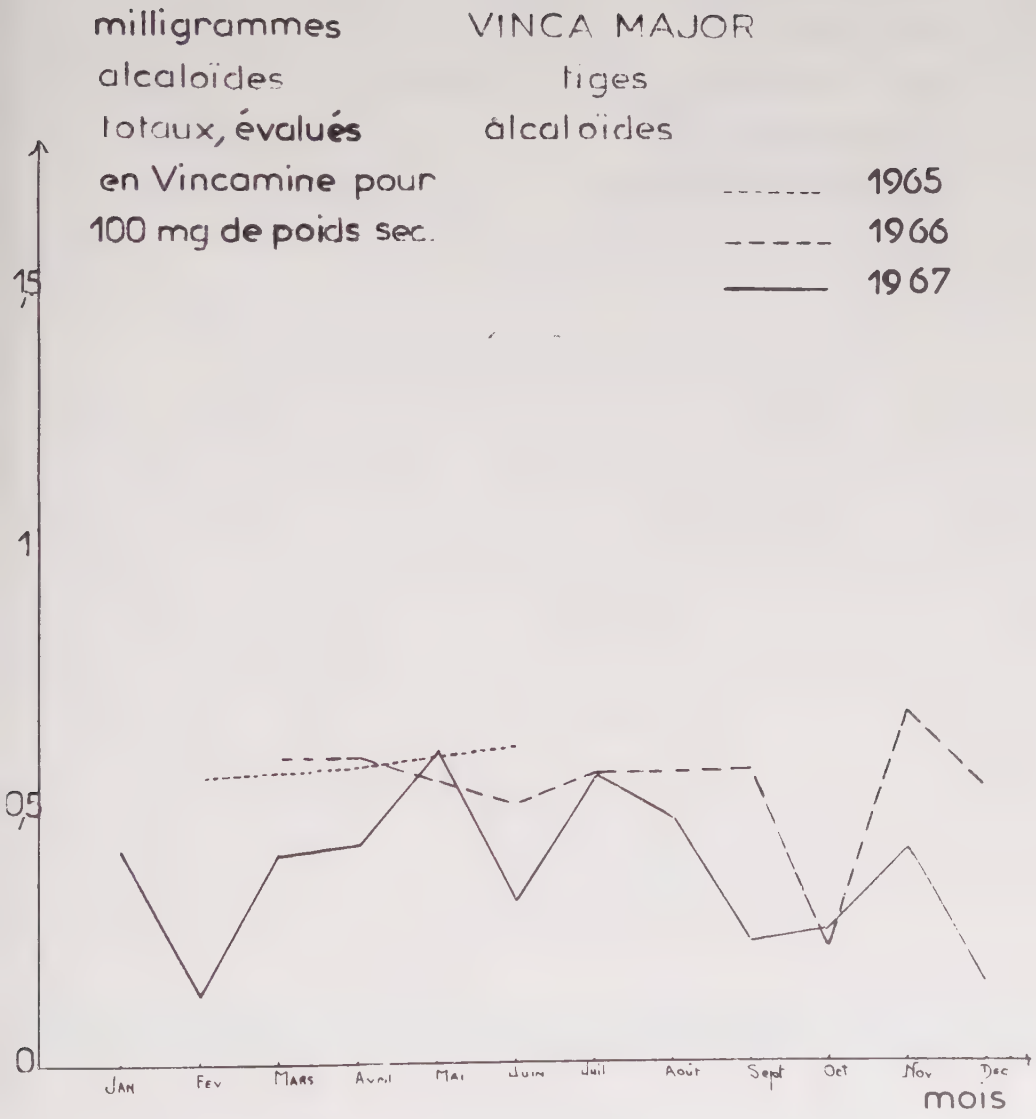

milligrammes
alcaloïdes
totaux
évalués en Vincamine
pour 100 mg de poids sec.
VINCA MEDIA
feuilles alcaloïdes
1966
1967
1,5
1
0,5
0
Jan
Fév
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov.
Dec
mois

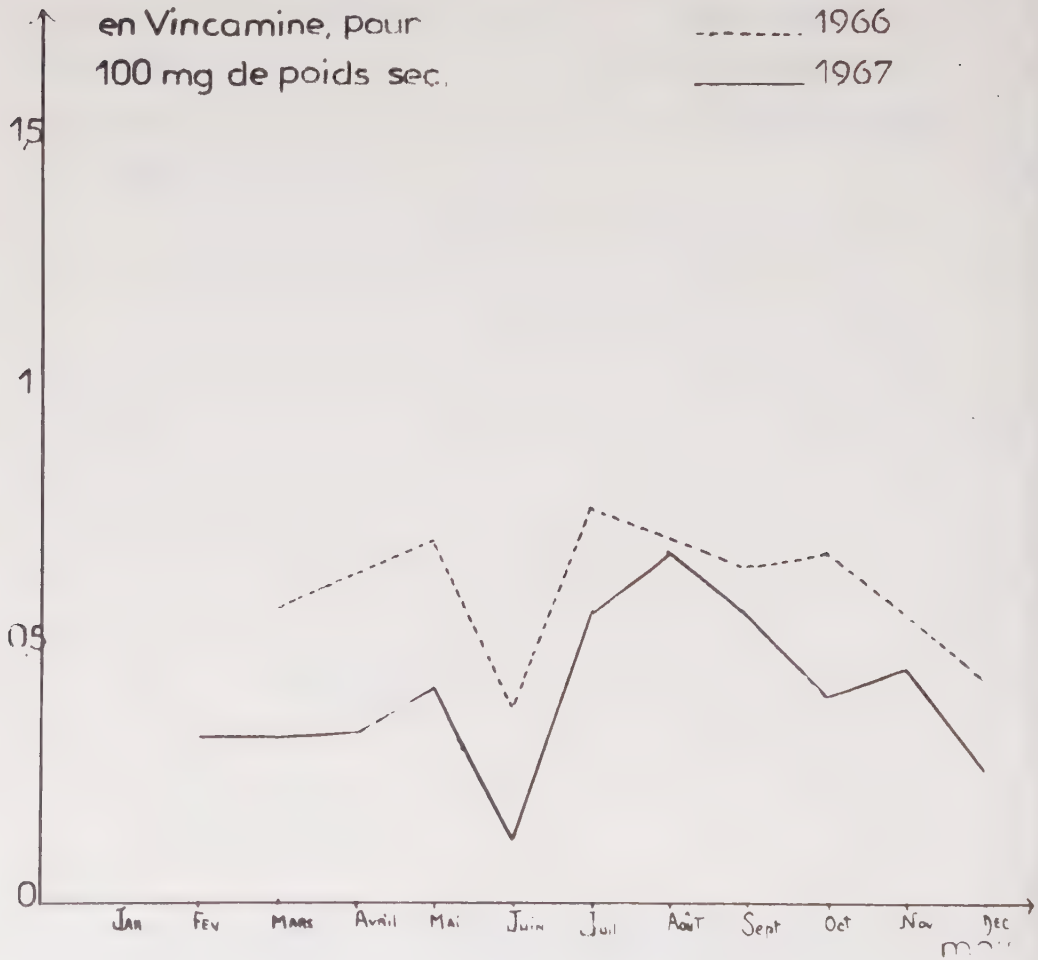

milligrammes
alcaloïdes
totaux
évalués en Vincamine
pour 100 mg de poids sec.
VINCA MINOR
feuilles alcaloïdes
1965
1966
1967
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec
mois

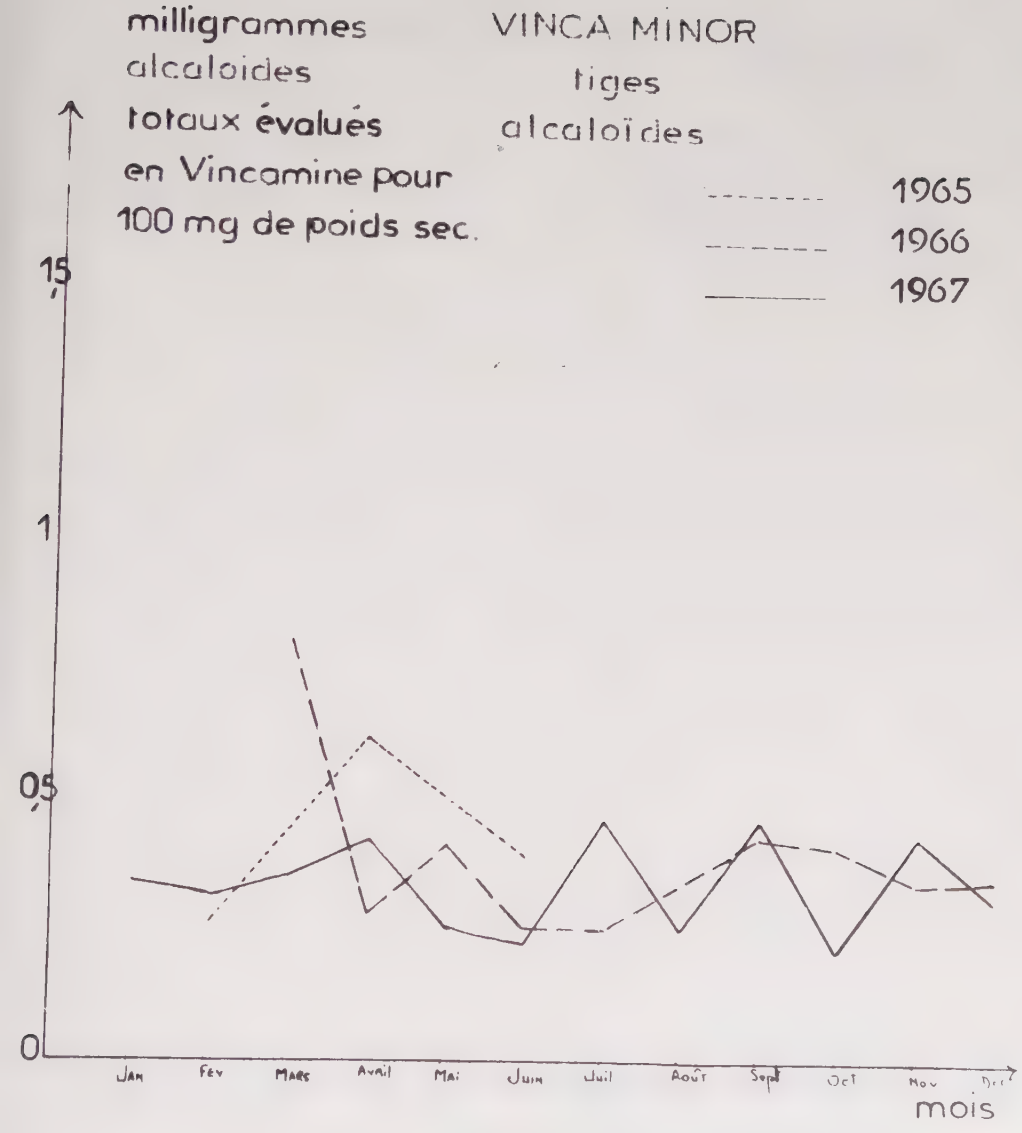
FEUILLES

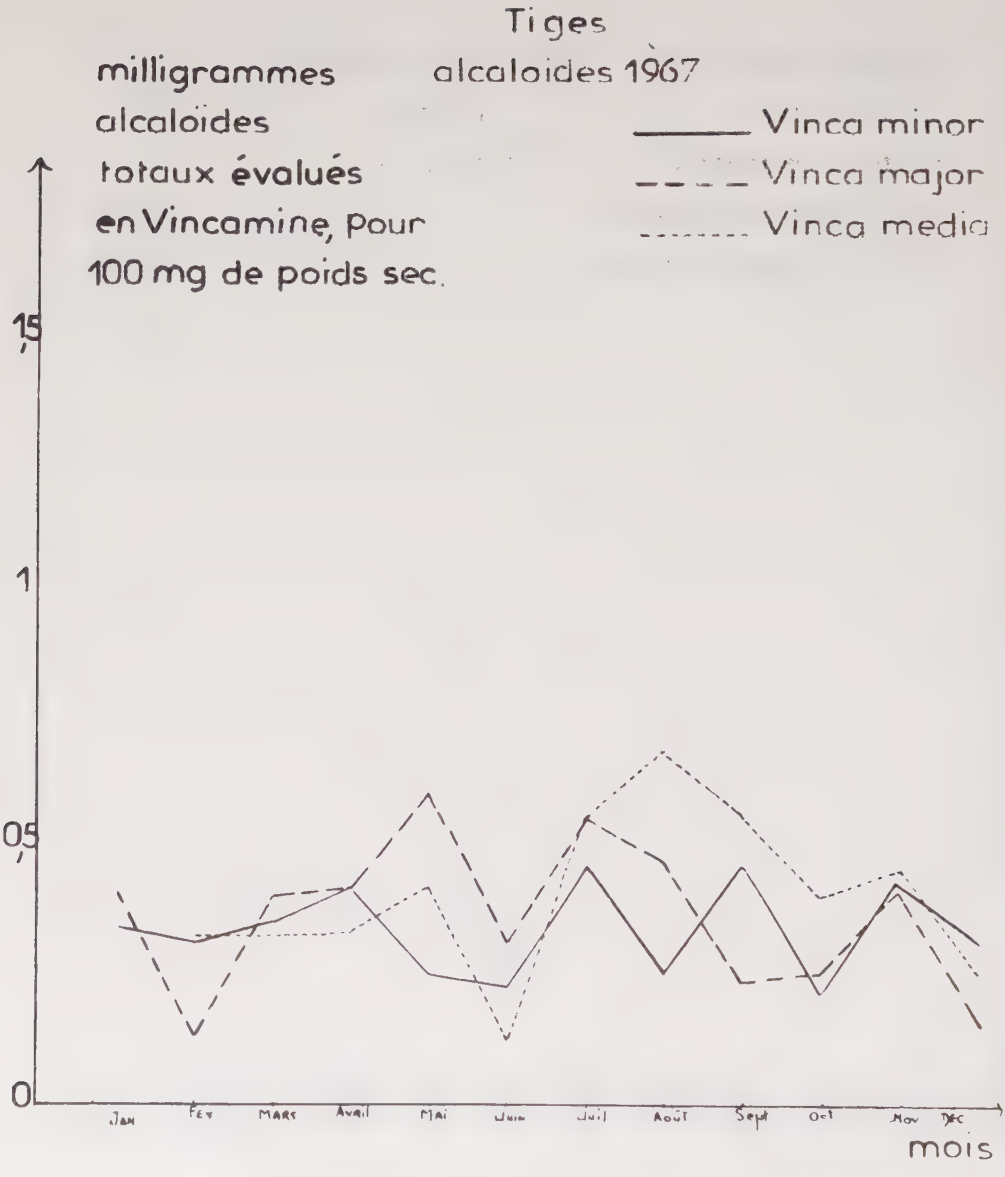
alcaloïdes 1967

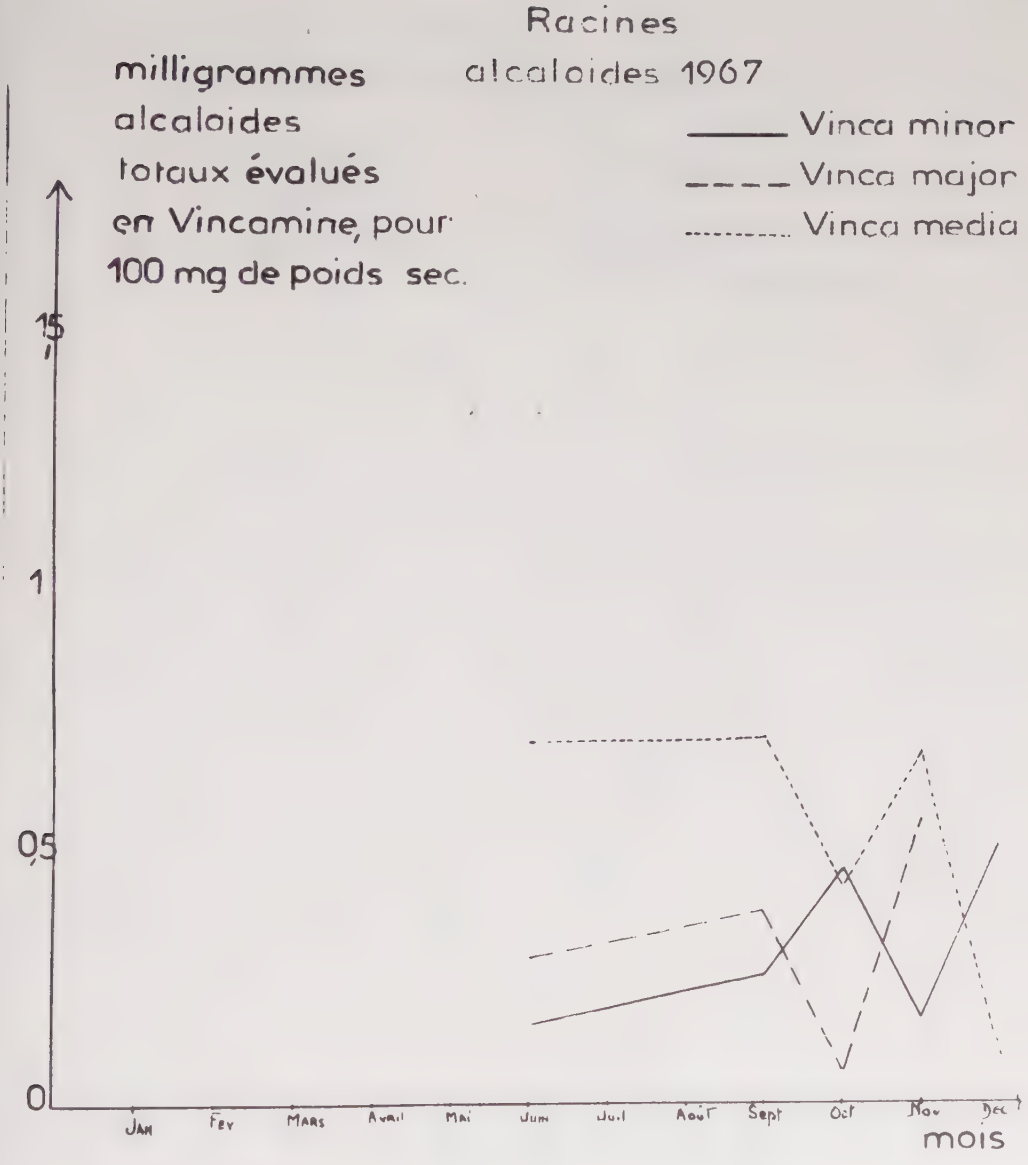


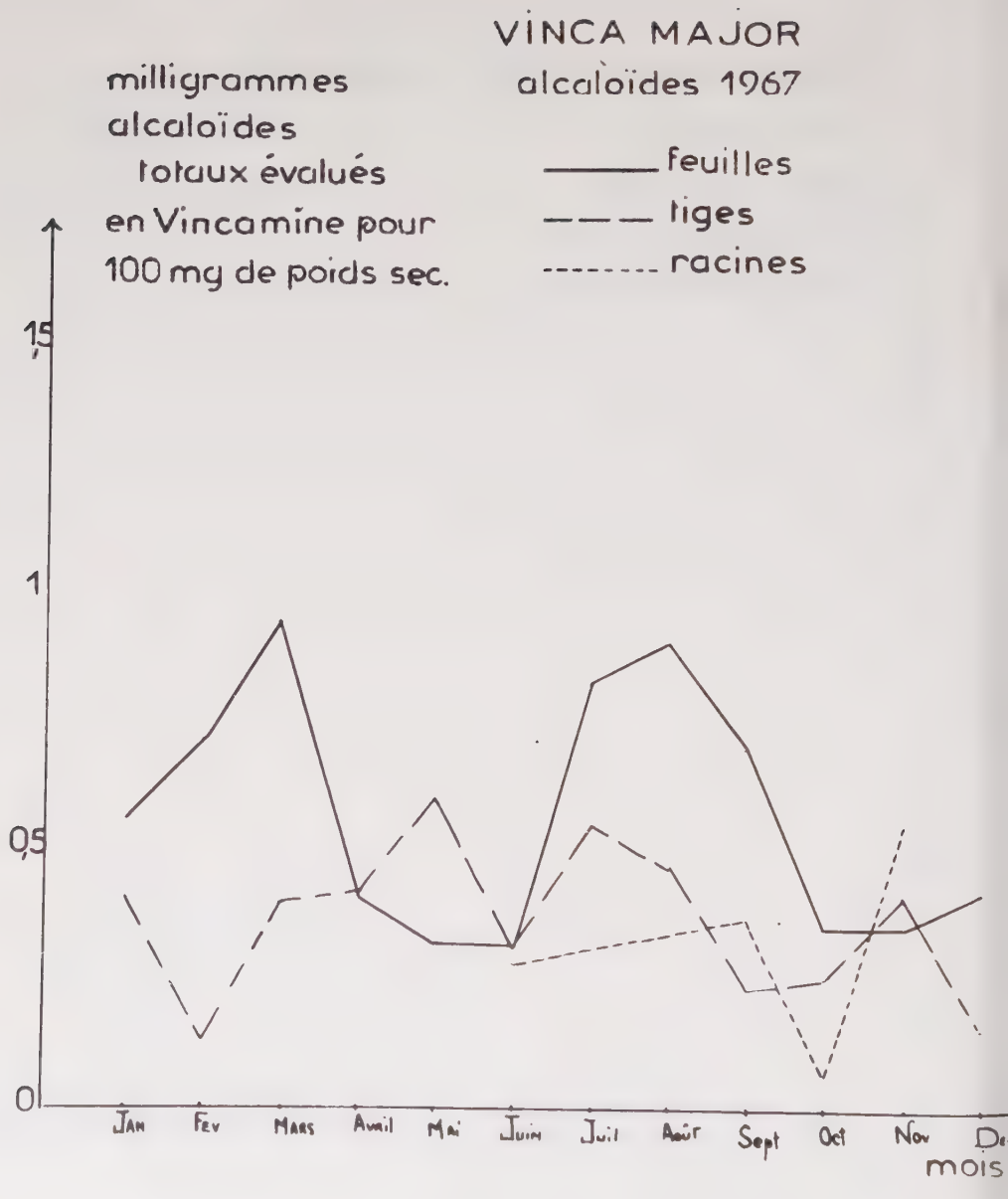

milligrammes
alcaloïdes
totaux, évalués
en Vincamine pour
100 mg de poids sec.
VINCA MAJOR
tiges
alcaloïdes
1965
1966
1967
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec
mois

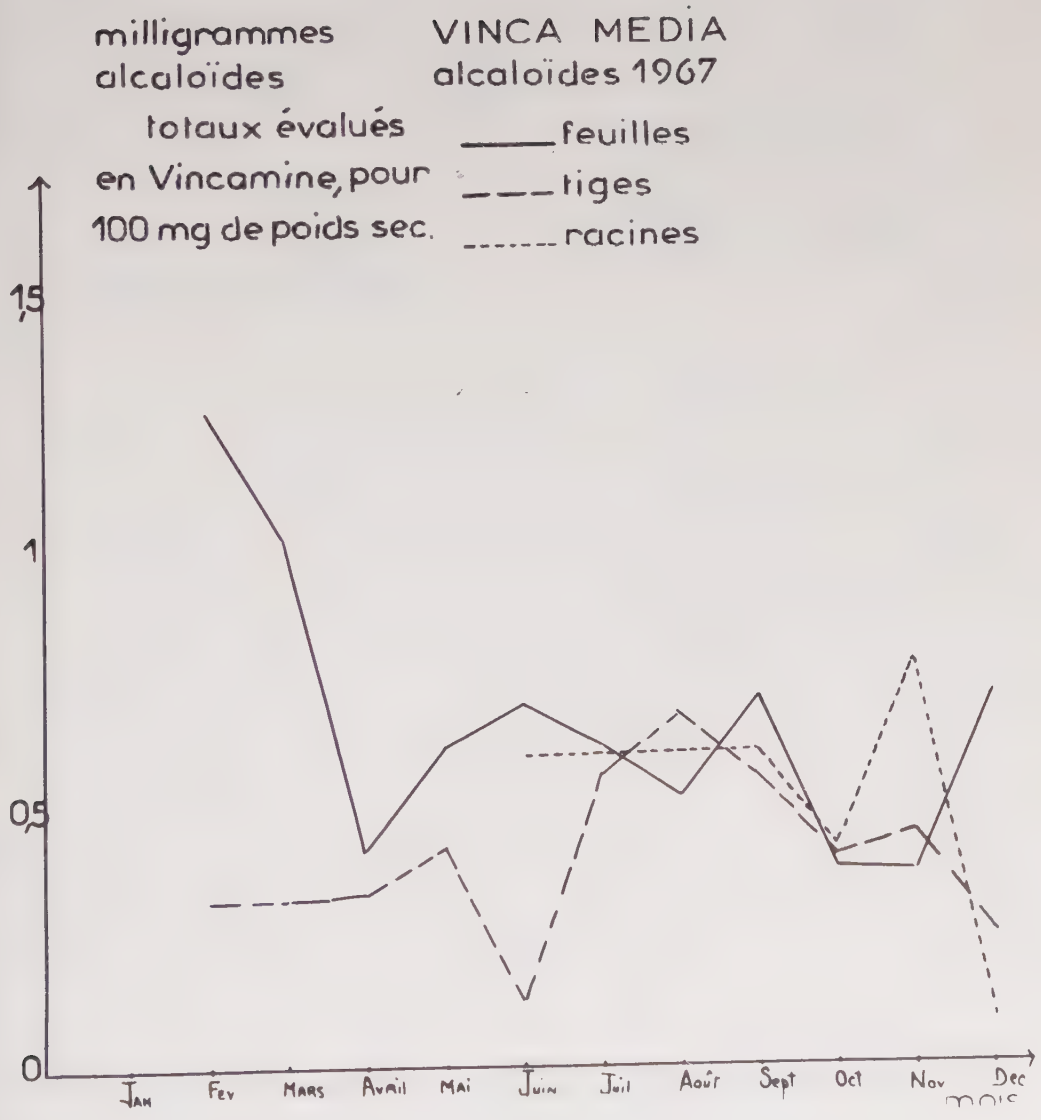

milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine, pour
100 mg de poids sec.
VINCA MEDIA
tiges
alcaloïdes
1966
1967
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec

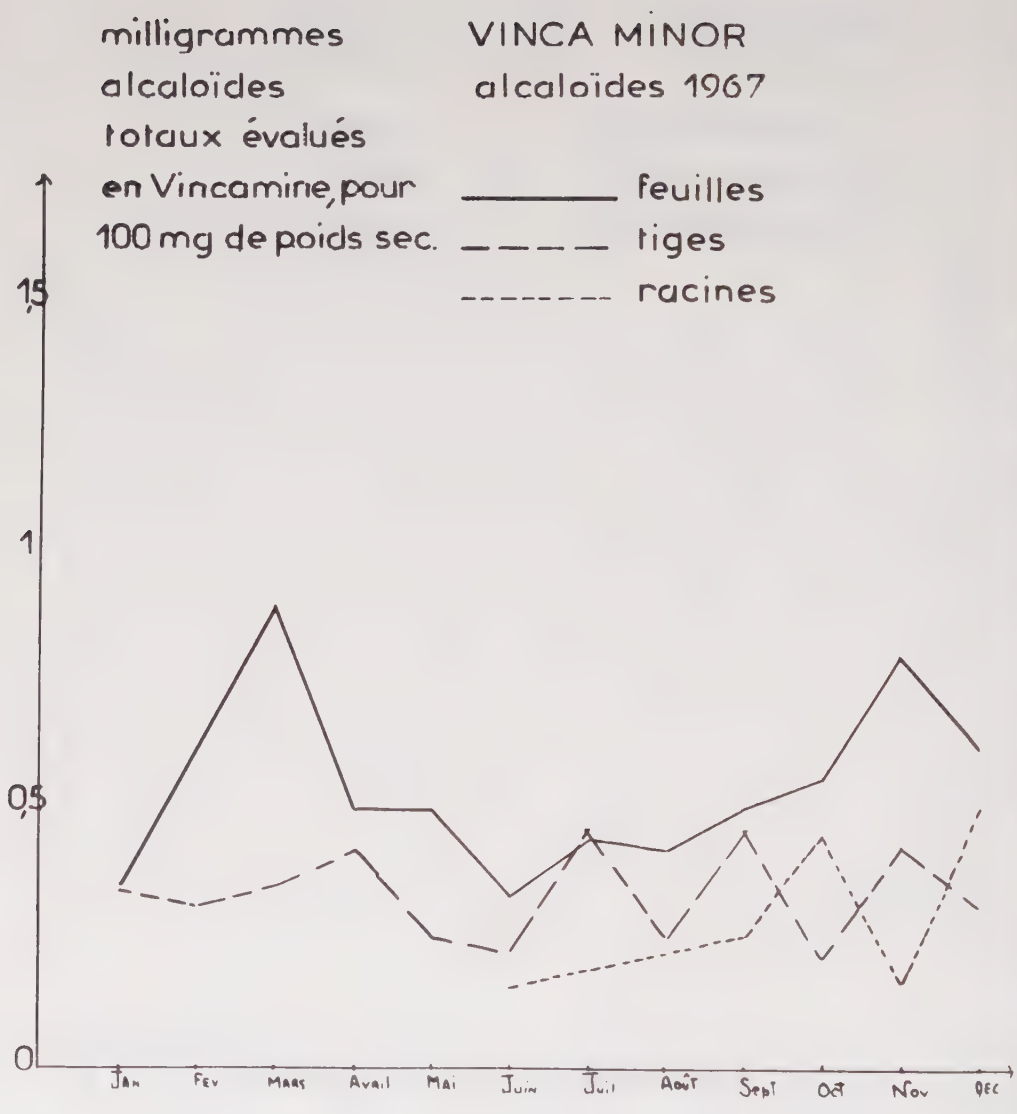

milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine pour
100 mg de poids sec.
VINCA MINOR
tiges
alcaloïdes
1965
1966
1967
1,5
1
0,5
0
Jan
Fév
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Déc
mois

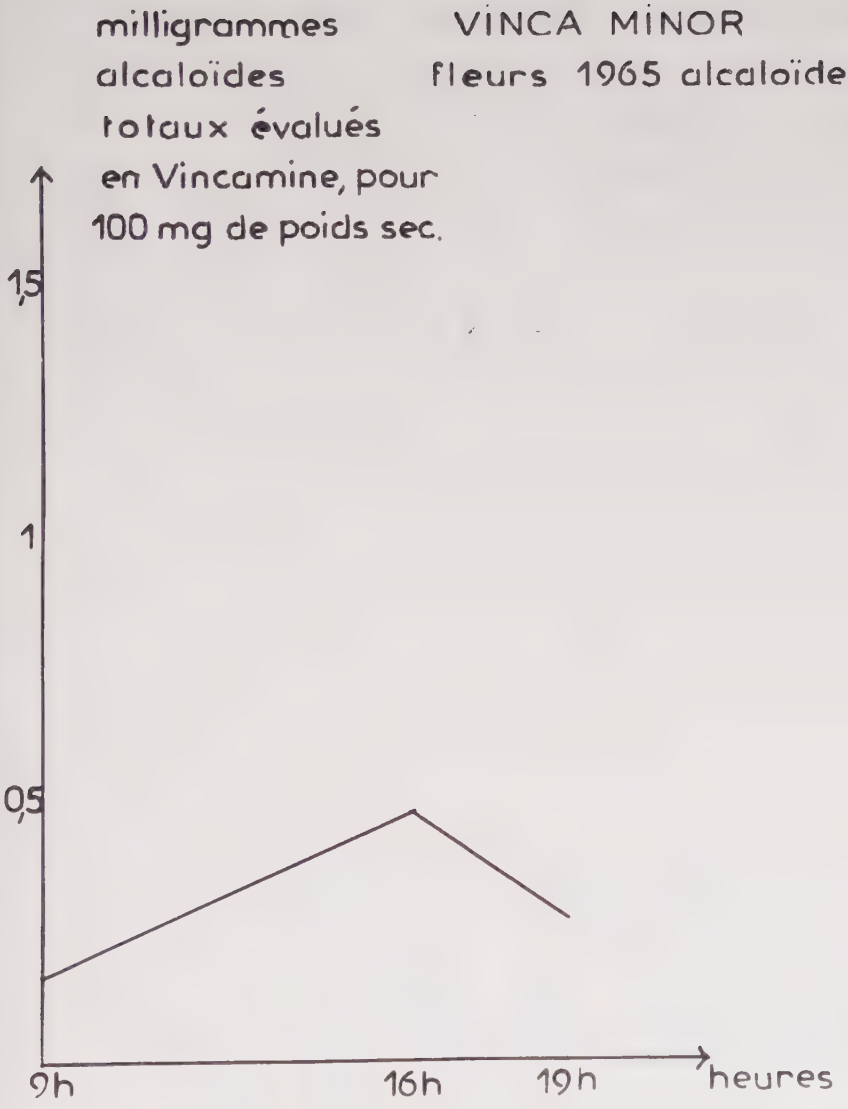

Tiges
milligrammes alcaloides 1967
alcaloïdes totaux évalués en Vincamine, pour 100 mg de poids sec.
Vinca minor
Vinca major
Vinca media
1,5
1
0,5
0
Jan
Fév
MARS
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Déc
mois

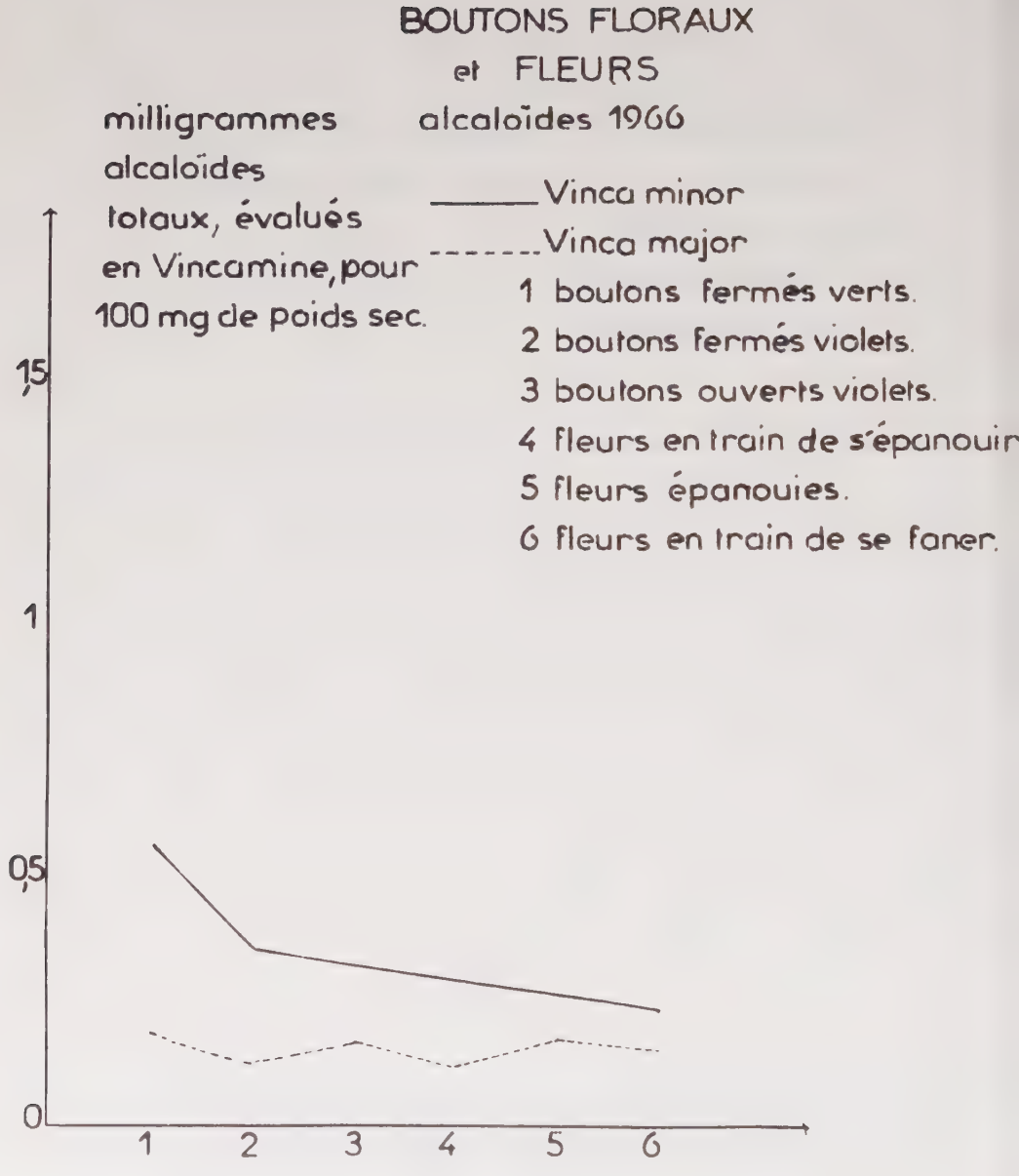

Racines
milligrammes alcaloides 1967
alcaloides totaux évalués en Vincamine, pour 100 mg de poids sec.
Vinca minor
Vinca major
Vinca media
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec
mois


VINCA MAJOR
alcaloïdes 1967
milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine pour
100 mg de poids sec.
feuilles
tiges
racines
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
mois


milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine, pour 100 mg de poids sec.
VINCA MEDIA
alcaloïdes 1967
feuilles
tiges
racines
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec
mois


milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine, pour
100 mg de poids sec.
VINCA MINOR
alcaloïdes 1967
feuilles
tiges
racines
1,5
1
0,5
0
Jan
Fev
Mars
Avril
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec


milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine, pour
100 mg de poids sec.
VINCA MINOR
fleurs 1965 alcaloïdes
1,5
1
0,5
9h
16h
19h
heures


BOUTONS FLORAUX
et FLEURS
milligrammes alcaloïdes 1966
alcaloïdes totaux, évalués en Vincamine, pour 100 mg de poids sec.
Vinca minor
Vinca major
1 boutons fermés verts.
2 boutons fermés violets.
3 boutons ouverts violets.
4 fleurs en train de s'épanouir
5 fleurs épanouies.
6 fleurs en train de se faner.
1,5
1
0,5
0
1
2
3
4
5
6

BOUTONS FLORAUX - FLEURS

milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec.

alcaloïdes 1967

_____ Vinca minor

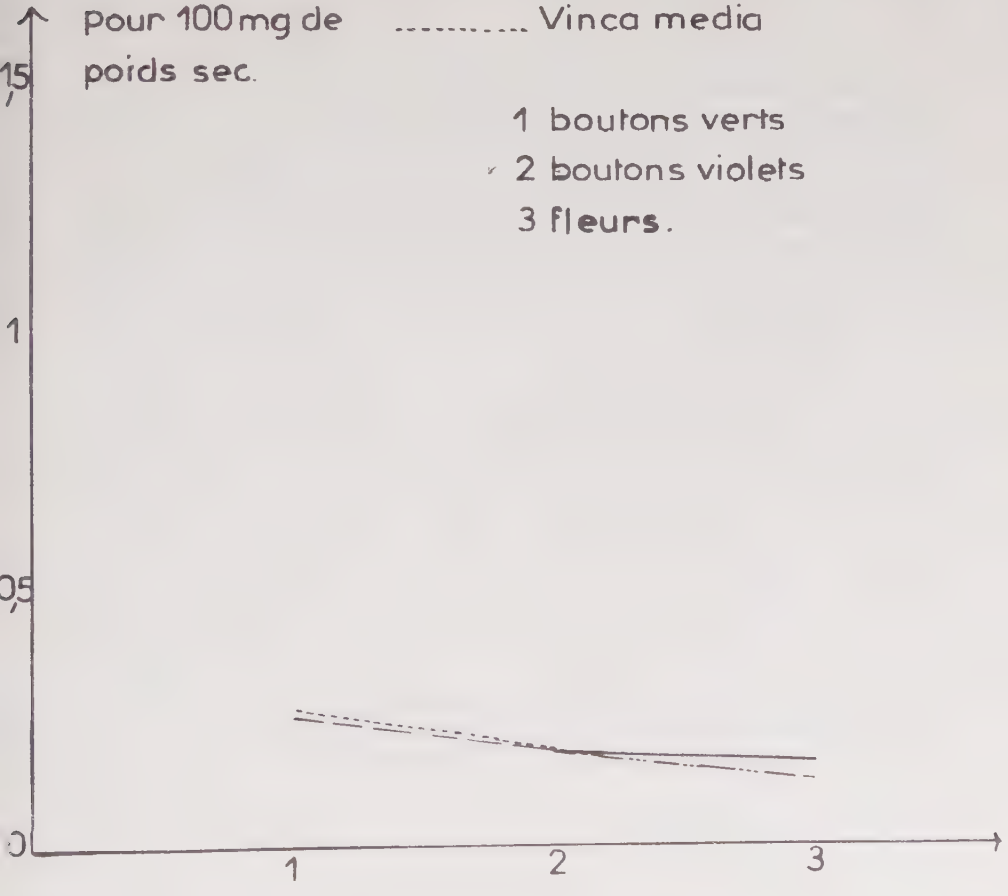
_ _ _ _ Vinca major

..... Vinca media

1 boutons verts

2 boutons violets

3 fleurs.



Ce fait ne semblait pas avoir été clairement établi jusqu'à ce jour ; au contraire les travaux antérieurs ont presque tous porté sur l'étude des racines.

D'autre part, dans ces feuilles, *chez les trois Pervenches, la quantité maximale d'alcaloïdes semble se trouver dans les mois du printemps*, et non dans ceux de l'automne comme le déclarait I. HAJKOVA et ses collaborateurs. Ceci est en accord avec les résultats de LYAPUNOVA (1964). Ces constatations ressortent nettement des courbes représentant nos dosages et des courbes représentant les spectres d'absorption des extraits en solution tamponnée à pH 4,5.

- *Au point de vue de la chimiotaxinomie, des différences très nettes sont mises en évidence, par ces mêmes courbes, entre le Vinca minor et les deux autres Vinca :* les spectres d'absorption des extraits du *Vinca major* et du *Vinca media*, en solution tamponnée à pH 4,5, sont analogues, c'est-à-dire que ces deux Pervenches renferment des alcaloïdes voisins ayant les mêmes maximum d'absorption (vers 235 et 280 nm), tandis que le *Vinca minor* renferme les mêmes types d'alcaloïdes mais également un autre groupe qui absorbe vers 330 nm.

D'autre part les courbes représentant les spectres d'absorption de la réaction avec la Tropéoline OO indiquent que tous les alcaloïdes du *Vinca minor* et du *Vinca major semblent réagir avec la Tropéoline OO, tandis qu'il se pourrait que quelques alcaloïdes particuliers au Vinca media ne réagissent pas*. Ces résultats sont en accord avec les opinions actuelles et en particulier avec les caractérisations effectuées par JANOT et ses collaborateurs (1965). Il y aurait alors chez le *Vinca major* et chez le *Vinca media* des mécanismes biosynthétiques, donc enzymatiques, différents, et on pourrait alors sans doute parler d'espèces différentes.

T R O I S I E M E P A R T I E

COMPARAISON DES RESULTATS DES DOSAGES DES ACIDES AMINES ET DES ALCALOIDES TOTAUX AU COURS DE LA VEGETATION DANS LES FEUILLES, LES FLEURS ET LES RACINES DU *VINCA MINOR*, DU *VINCA MAJOR* ET DU *VINCA MEDIA* PENDANT LES ANNEES 1966 ET 1967.

Les courbes et les tableaux suivants (Tableaux XXXII à XXXVI) indiquent que les alcaloïdes des *Vinca*, de même que les acides aminés subissent des variations quantitatives selon les différents stades de végétation.

Les quantités maximales d'alcaloïdes correspondent aux mêmes époques que les quantités maximales d'acides aminés, soit au début de la floraison au stade des boutons floraux, et au moment de la fructification.

KLYSHEV et KORDAKOV trouvent des résultats semblables sur le *Papaver* sommiferum (KLYSHEV 1964); ils rapportent que la quantité maximale d'acides aminés libres coïncide avec le stade bouton floral de la plante, c'est-à-dire le stade de la biosynthèse intense des alcaloïdes.

Ceci semble logique car si B.A. RUBIN déclare que les racines synthétisent des alcaloïdes (RUBIN 1963), ZULALIAN et coll. ont démontré que le tissu primordial floral était capable d'une synthèse totale des alcaloïdes (ZULALIAN).

Les alcaloïdes ne sont donc pas des substances de déchet ou de rejet mais des métabolites normaux, sujets aux variations physiologiques de la plante au cours de la végétation.

Toutefois, il n'est pas encore possible de situer la place des différents alcaloïdes dans l'ensemble des métabolismes intermédiaires.

Nos résultats et nos moyens d'étude ne nous permettent pas de discuter les étapes de la biosynthèse des alcaloïdes.

La discussion des hypothèses concernant l'action du géraniol, de la loganine, de l'acide mévalonique et du tryptophane exige des travaux beaucoup plus spécialisés que les nôtres (BATTERSBY 1966, LEETE 1965 et 1966, MONEY 1965, GROEGER 1964) ; il faudrait utiliser des précurseurs marqués sur des cultures de tissus puisque l'on a démontré que l'on pouvait réaliser des cultures d'Apocynacées et que ces tissus pouvaient synthétiser des alcaloïdes ; (HARRIS 1964, BODER 1964, BABCOK 1962 et 1965). Le type de mécanisme biosynthétique est en effet un meilleur critère des affinités taxinomiques que la seule présence de tel ou tel alcaloïde (MOTHES 1964). Il faudrait notamment envisager la question des précurseurs et de la biogénèse (PARIS 1965) et approfondir en particulier la question de l'équipement enzymatique. L'équipe du laboratoire travaille dans ce sens.

TABLEAU XXXII

VINCA MAJOR (FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1966		Année 1967	
						Janv. 19h	6,82
		Févr. 9h	2,04				
		Févr.19h	4,03			Févr. 19h	15,54
Mars 19h	14,99			Mars 19h	16,38	mars 19h	20,50
		Avr. 9h	15,40				
		Avr. 19h	18,84	Avr. 19h	14,57	Avr. 19h	13,04
				Mai 19h	2,71	Mai 19h	13,65
		Juin 9h	5,69				
		Juin 19h	5,96	Juin 19h	2,27	Juin 19h	4,64
				Juil. 19h	9,71	Juil. 19h	4,76
						Août 19h	11,42
				Sept. 19h	3,75	Sept. 19h	4,30
				Oct. 19h	3,95	Oct. 19h	5,79
				Nov. 19h	3,40	Nov. 19h	4,53
				Déc. 19h	2,78	Déc. 19h	7,70

TABLEAU XXXIII

VINCA MEDIA (FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1967	
				Janvier 19 h	
				Février 19 h	39,21
		Mars 19 h	20,86	Mars 19 h	27,76
				Avril 19 h	35,76
Mai 19 h	8,01	Mai 19 h	6,60	Mai 19 h	18,50
		Juin 19 h	11,24	Juin 19 h	7,38
		Juillet 19 h	6,52	Juillet 19 h	5,55
				Août 19 h	9,41
		Septembre 19 h	8,70	Septembre 19 h	2,90
		Octobre 19 h	14,36	Octobre 19 h	4,71
		Novembre 19 h	7,96	Novembre 19 h	1,15
		Décembre 19 h	6,05	Décembre 19 h	5,25

TABLEAU XXXIV

VINCA MINOR

(FEUILLES)

Micromoles d'acides aminés totaux, pour 100 mg de poids sec.

Année 1964		Année 1965		Année 1966		Année 1967	
						Janv. 19 h	3,65
		Févr. 9 h	4,23				
		Févr. 19h	5,84			Févr. 19 h	8
Mars 19 h	3,34			Mars 19 h	15,70	Mars 19 h	8,84
		Avr. 9 h	6,07				
		Avr. 19 h	10,33	Avr. 19 h	9,14	Avr. 19 h	4,76
Mai 19 h	2,95			Mai 19 h	15,33	Mai 19 h	12,90
		Juin 9 h	10,66				
		Juin 19 h	8,61	Juin 19 h	4,04	Juin 19h	6,26
				Juil. 19 h	4,12	Juil. 19h	4,87
						Août 19h	5,65
				Sept.19 h	4,96	Sept. 19 h	7,01
				Oct. 19 h	7,35	Oct. 19 h	7,80
				Nov. 19 h	5,18	Nov. 19 h	5,63
				Déc. 19 h	5,85	Déc. 19 h	3,21

T A B L E A U X X X V

BOUTONS FLORAUX ET FLEURS

Micromoles d'acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.

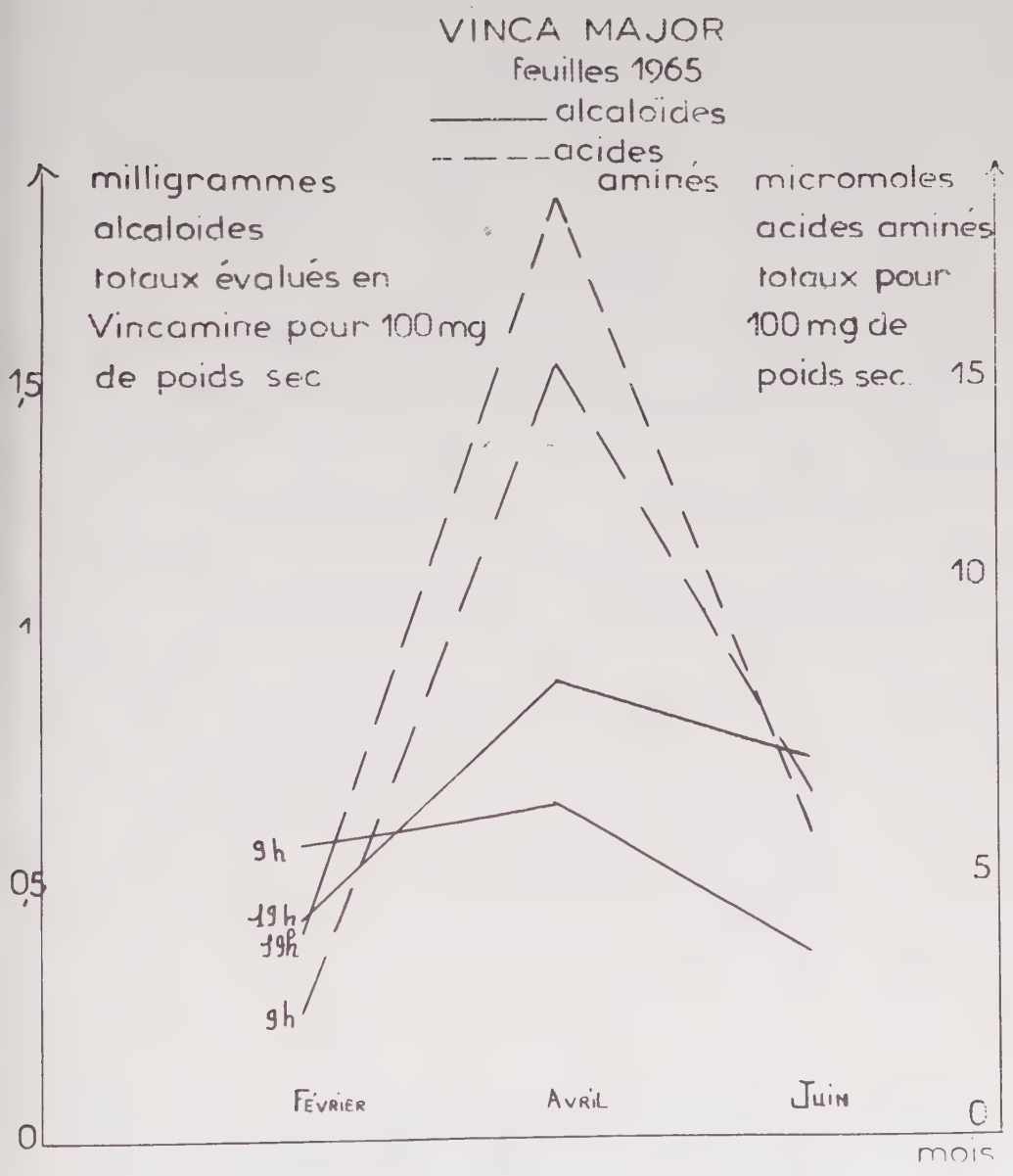
	Vinca major		Vinca media	Vinca minor	
	1966	1967	1967	1966	1967
Boutons verts	31,32	41,45	28,80	16,10	
Boutons fermés violets	21,47	12,81		17,69	20,31
Boutons ouverts violets	14,85			13,70	
Fleurs en train de s'épanouir		8,63		10,12	9,37
Fleurs épanouies	13,35			8,75	
Fleurs en train de se faner	12,98			6,59	

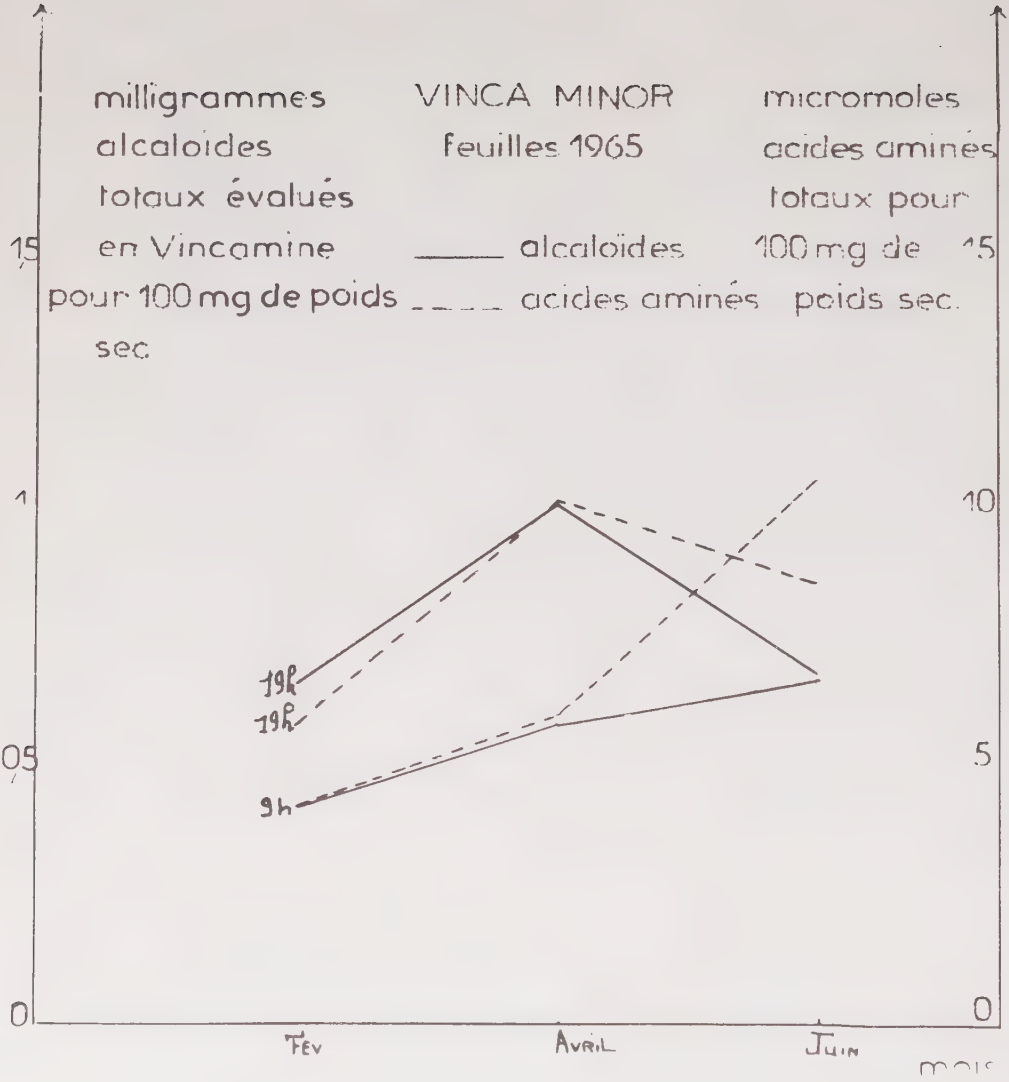
T A B L E A U X X X V I

R A C I N E S 1 9 6 7

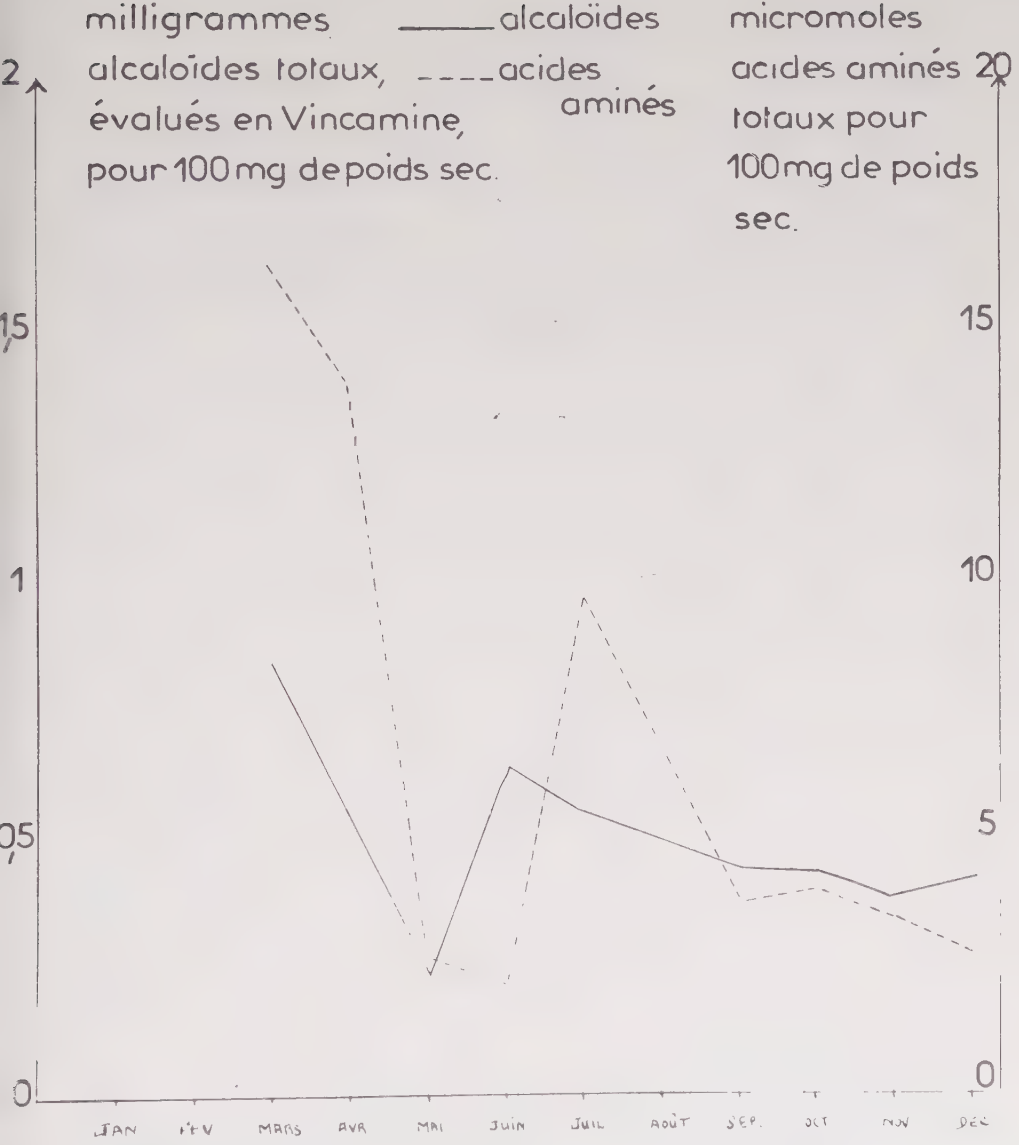
Micromoles d'acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.

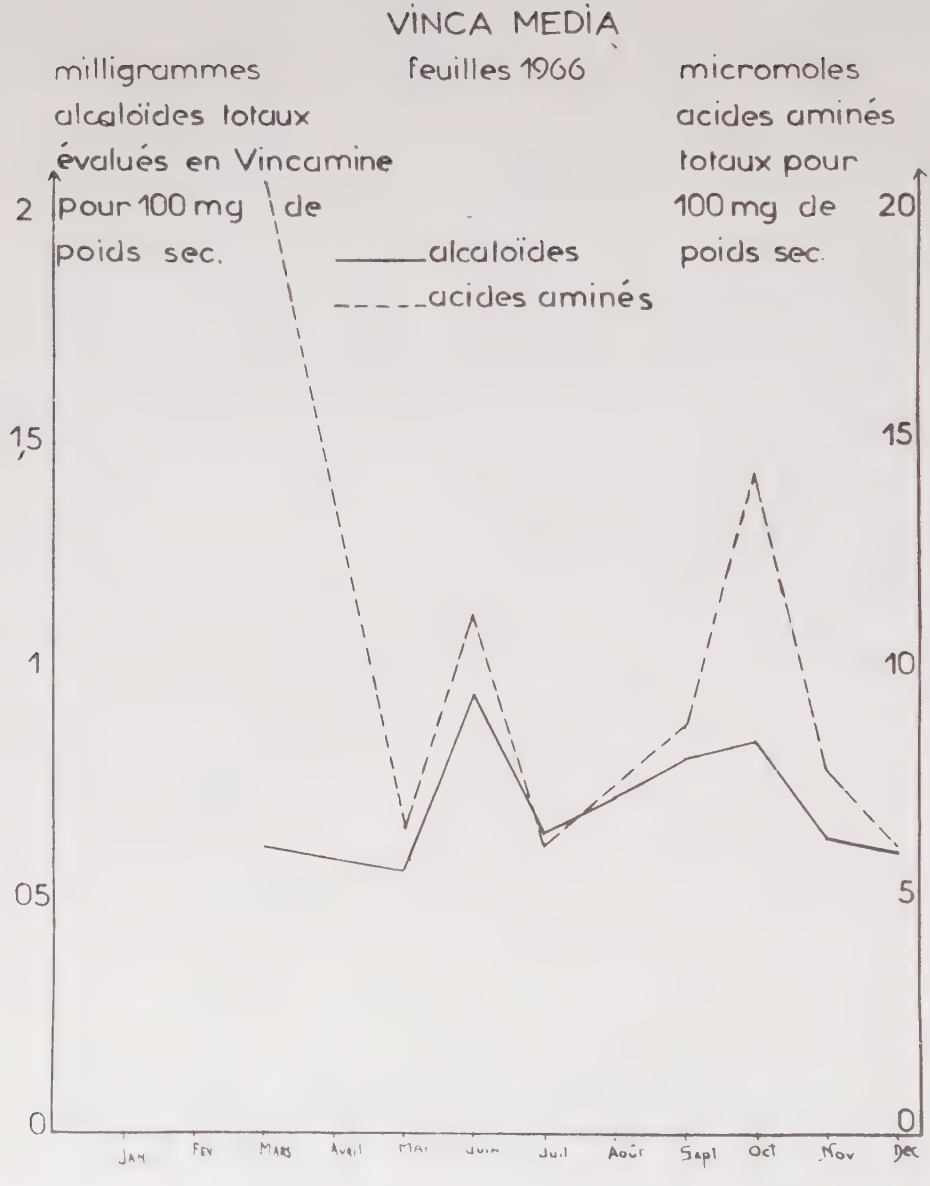
Mois	Vinca major	Vinca media	Vinca minor
Juin	8,76	0,59	14,85
Septembre	1,49	2,78	4,45
Octobre	1,27	5,06	6,68
Novembre	3,53	12,16	4,32
Décembre		6,29	6,55

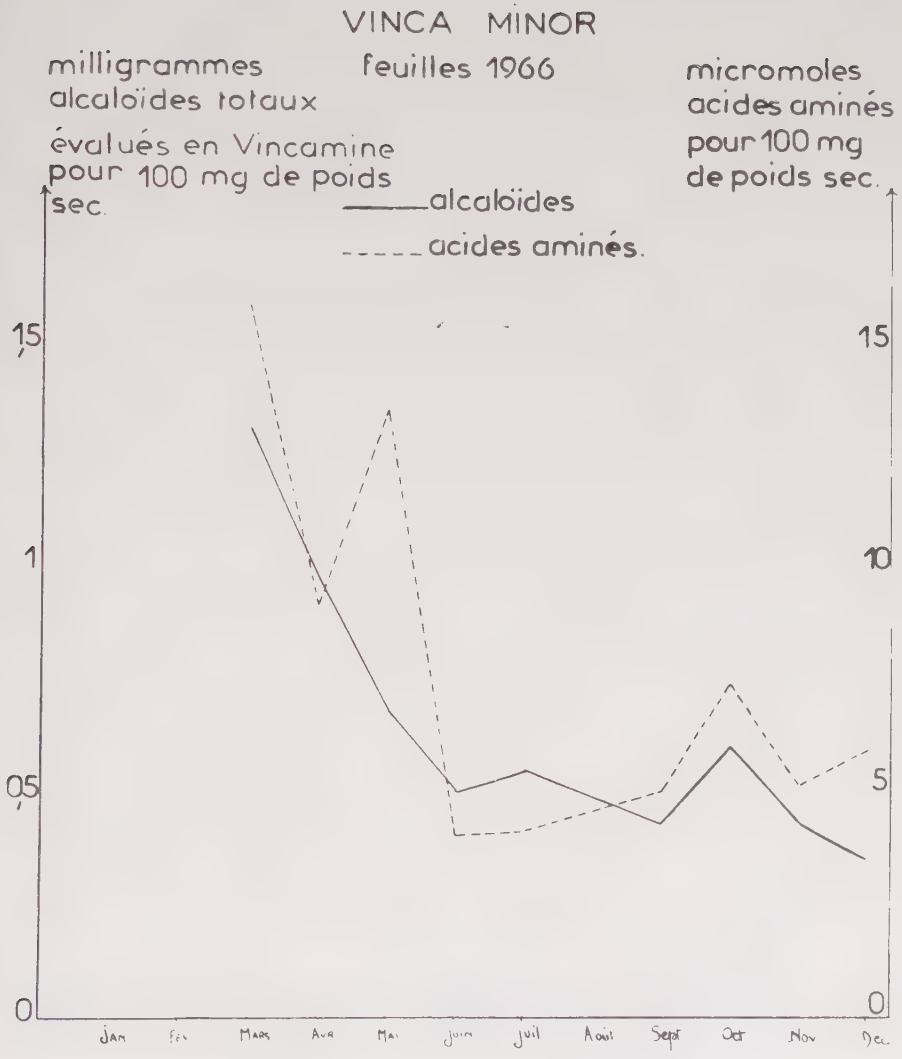

VINCA MAJOR
feuilles 1965
alcaloïdes
acides aminés
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec
micromoles acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.
1,5
1
0,5
0
15
10
5
0
9h
19h
19h
9h
Février
Avril
Juin
mois


milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec
VINCA MINOR
feuilles 1965
alcaloïdes
acides aminés
micromoles acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.
1,5
1
0,5
0
15
10
5
0
19h
19h
9h
Fév
Avril
Juin
mois

VINCA MAJOR
feuilles 1966




VINCA MEDIA
feuilles 1966
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec.
micromoles acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.
alcaloïdes
acides aminés
2
1,5
1
05
0
20
15
10
5
0
JAN
FEV
MARS
Avril
MAI
JUIN
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Dec


VINCA MINOR
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec.
feuilles 1966
micromoles acides aminés pour 100 mg de poids sec.
alcaloïdes
acides aminés.
1,5
1
0,5
0
15
10
5
0
Jan
Fév
Mars
Avr
Mai
Juin
Juil
Août
Sept
Oct
Nov
Déc

VINCA MAJOR

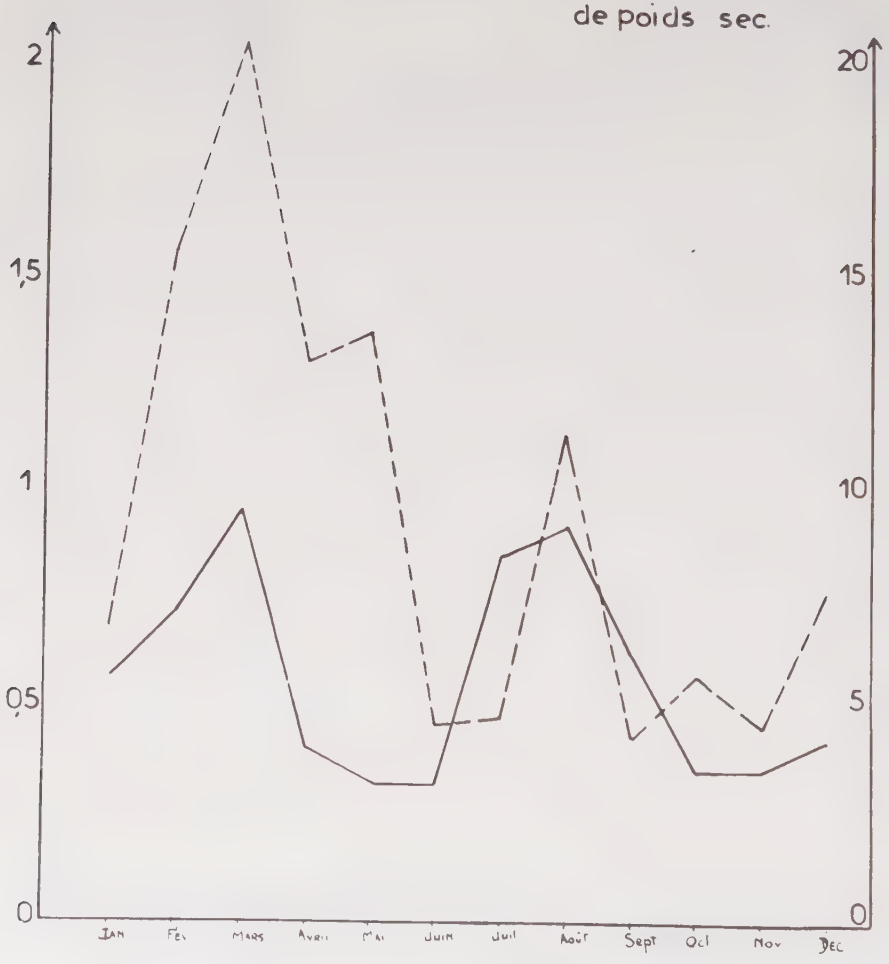
feuilles 1967

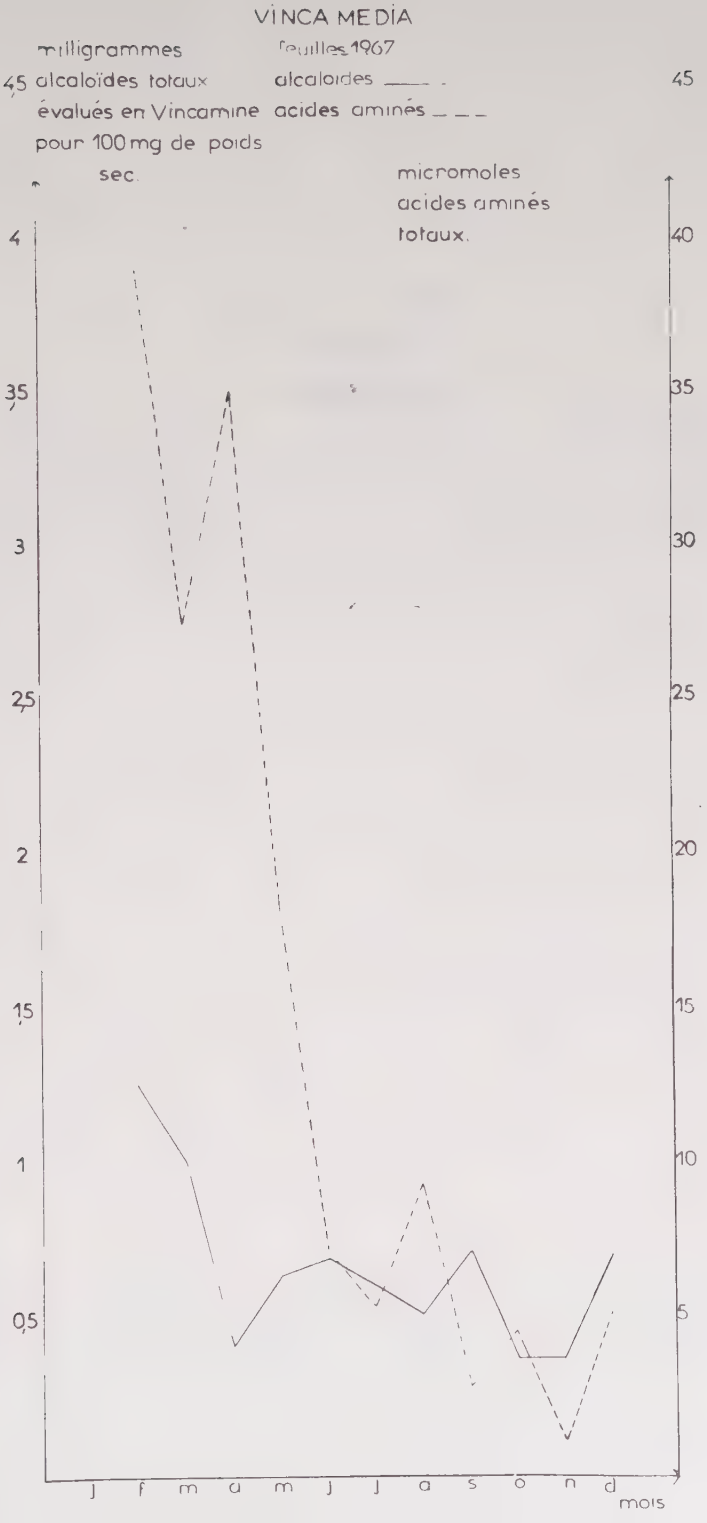
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec.

——— alcaloïdes

– – – acides aminés

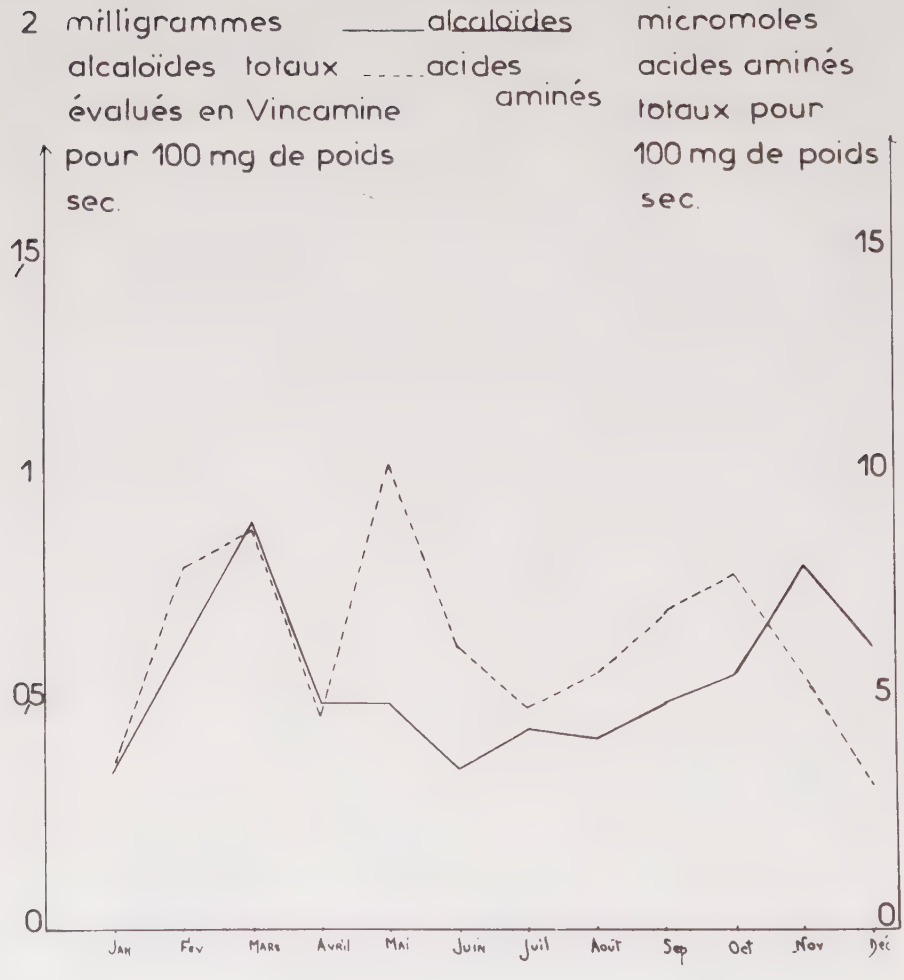
micromoles acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.

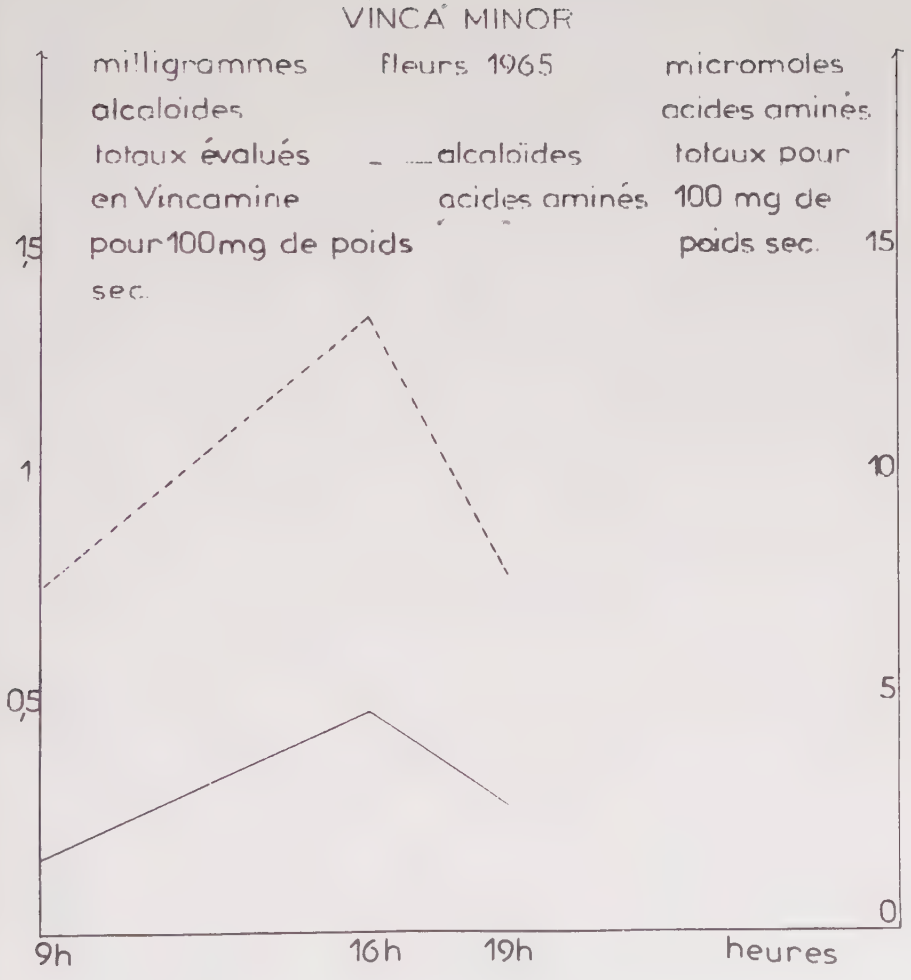



VINCA MEDIA
milligrammes
feuilles 1967
4,5 alcaloïdes totaux
alcaloïdes ——
évalués en Vincamine
acides aminés – – –
pour 100 mg de poids
sec.
micromoles
acides aminés
totaux.
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
40
35
30
25
20
15
10
5
j f m a m j j a s o n d
mois

VINCA MINOR

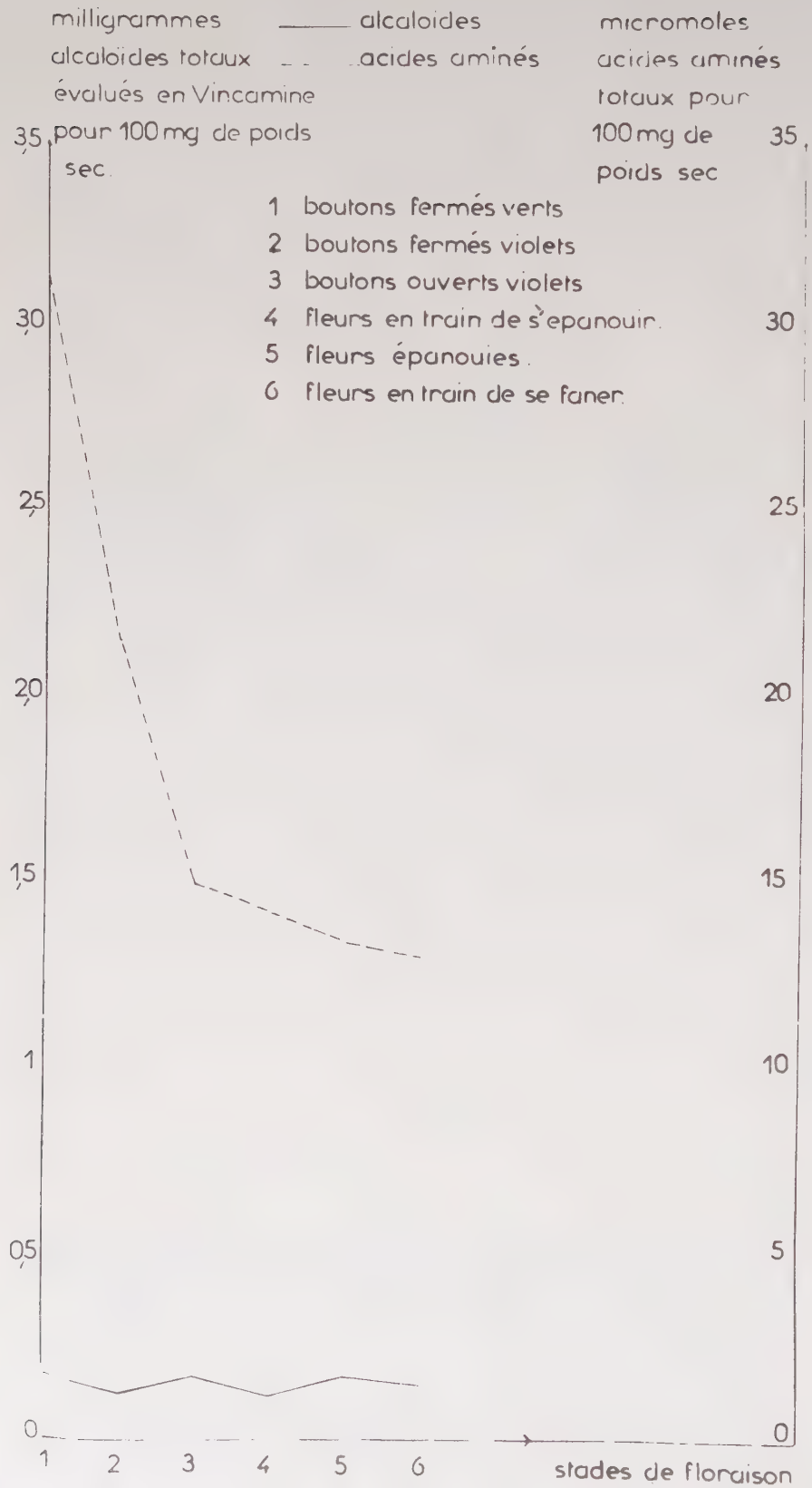
feuilles 1967

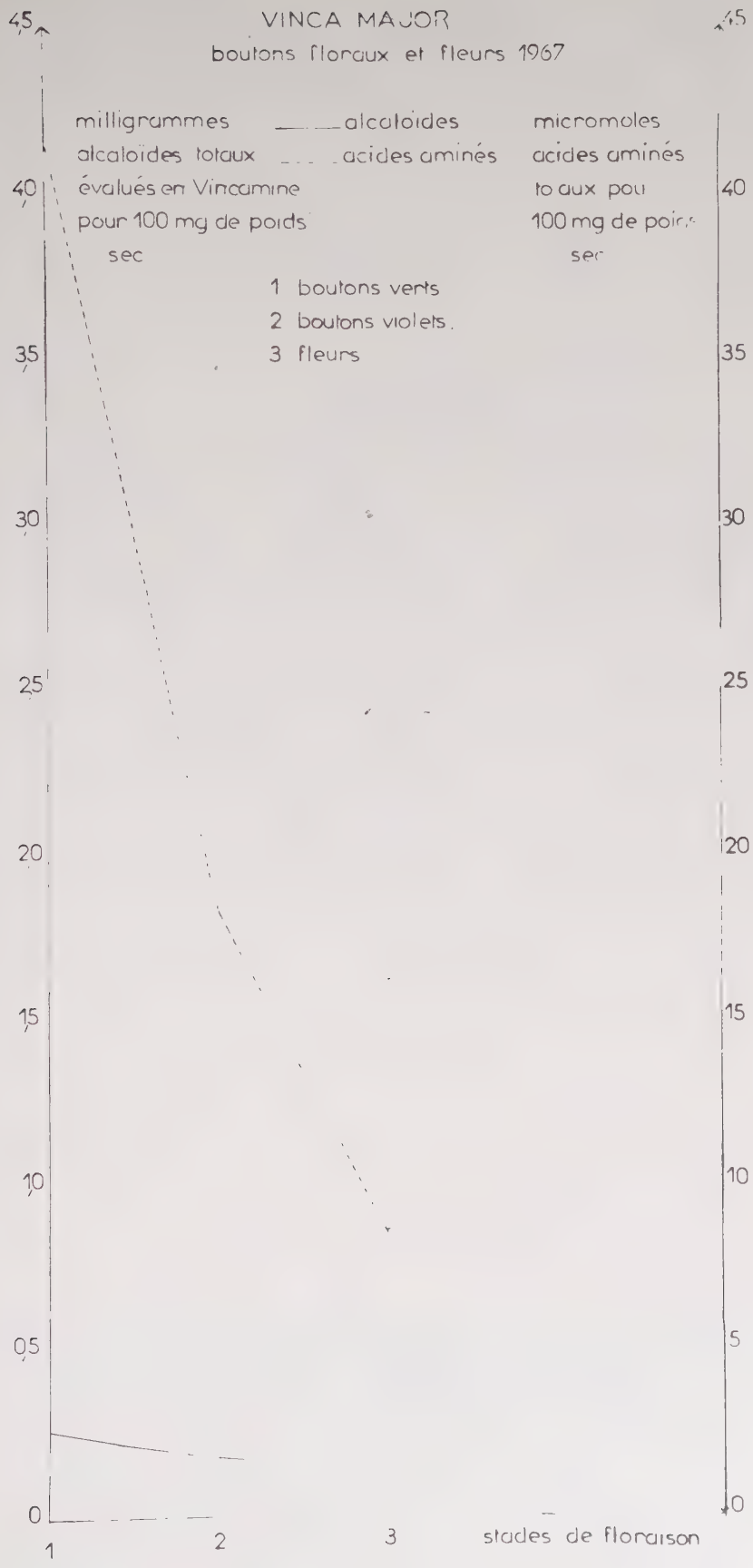



VINCA MINOR
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec.
fleurs 1965
alcaloïdes
acides aminés
micromoles acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.
1,5
1
0,5
15
10
5
0
9h
16h
19h
heures

VINCA MAJOR

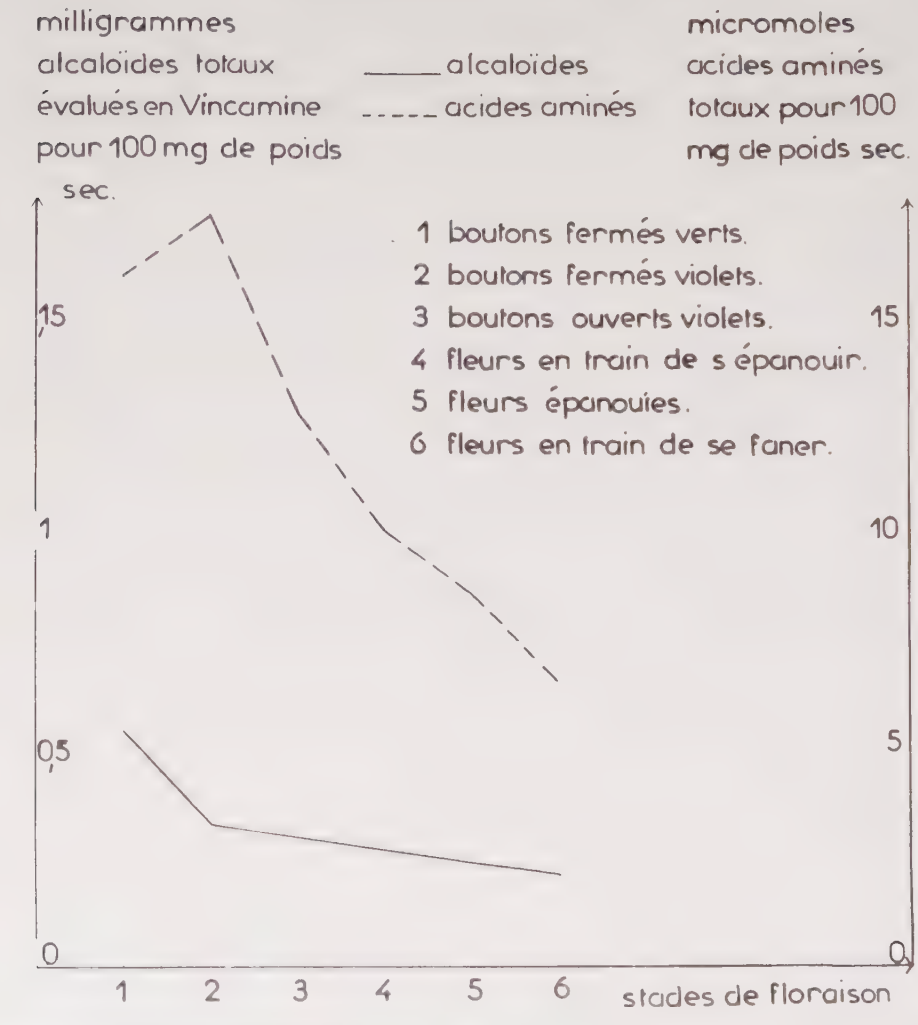
boutons floraux et fleurs 1966




VINCA MAJOR
boutons floraux et fleurs 1967
milligrammes
alcaloïdes totaux
évalués en Vincamine
pour 100 mg de poids sec
alcaloïdes
acides aminés
micromoles
acides aminés
totaux pour
100 mg de poids sec
1 boutons verts
2 boutons violets
3 fleurs
45
40
35
30
25
20
15
10
0,5
0
1
2
3
stades de floraison

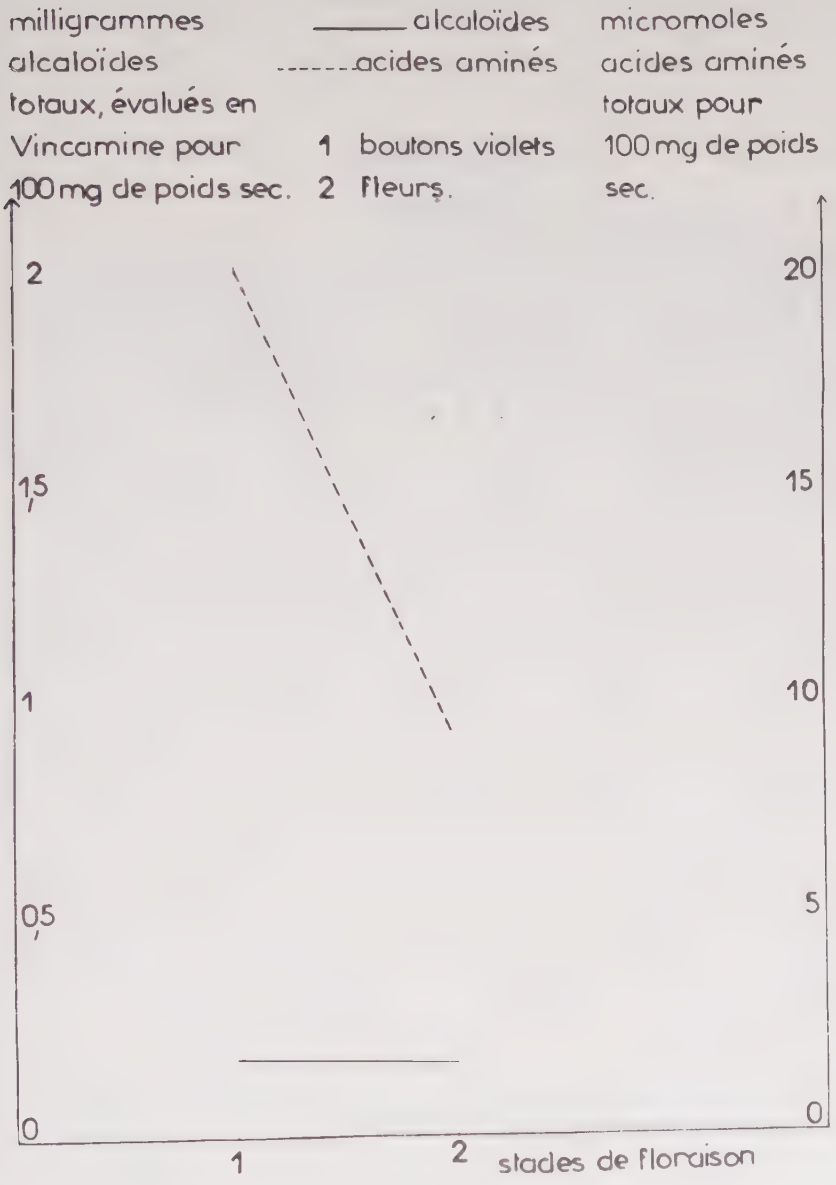
VINCA MINOR

boutons floraux et fleurs 1966

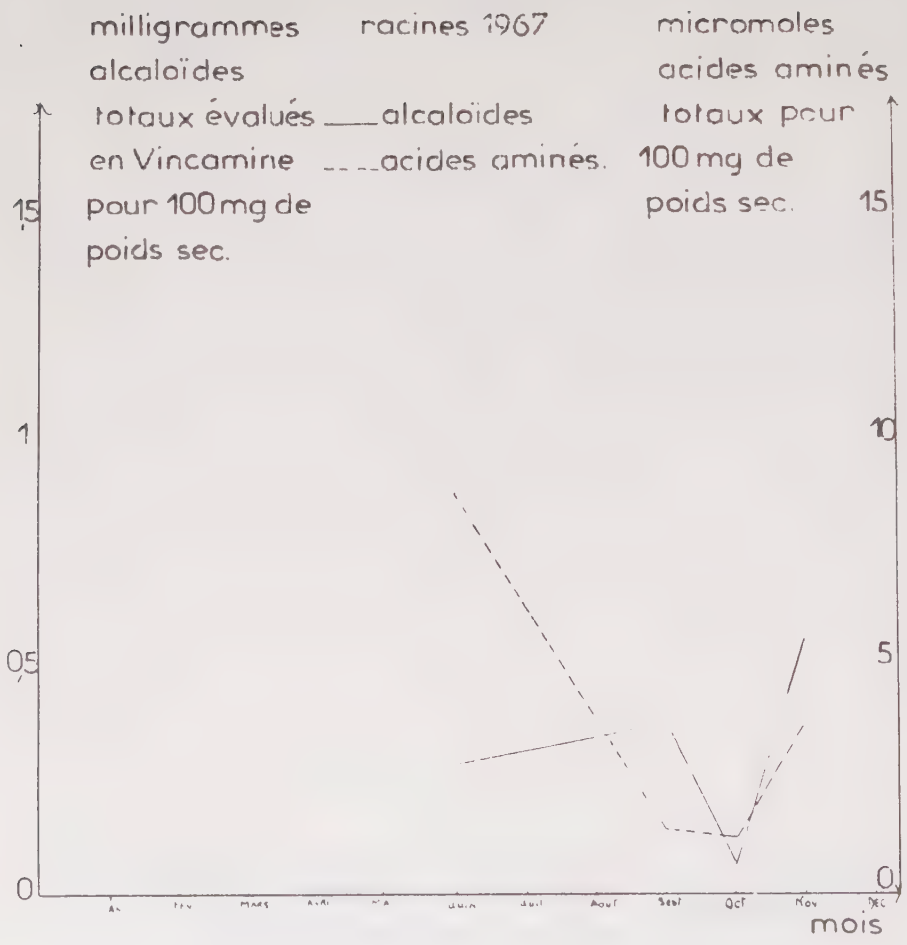


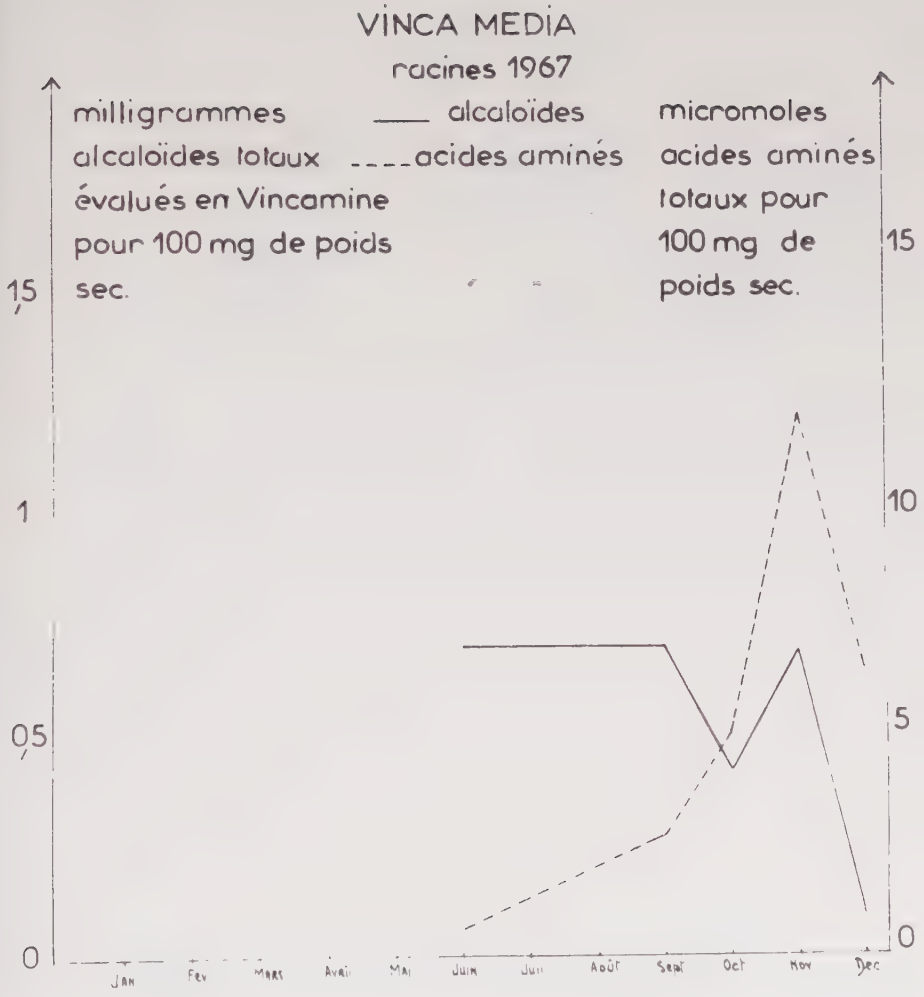
VINCA MINOR

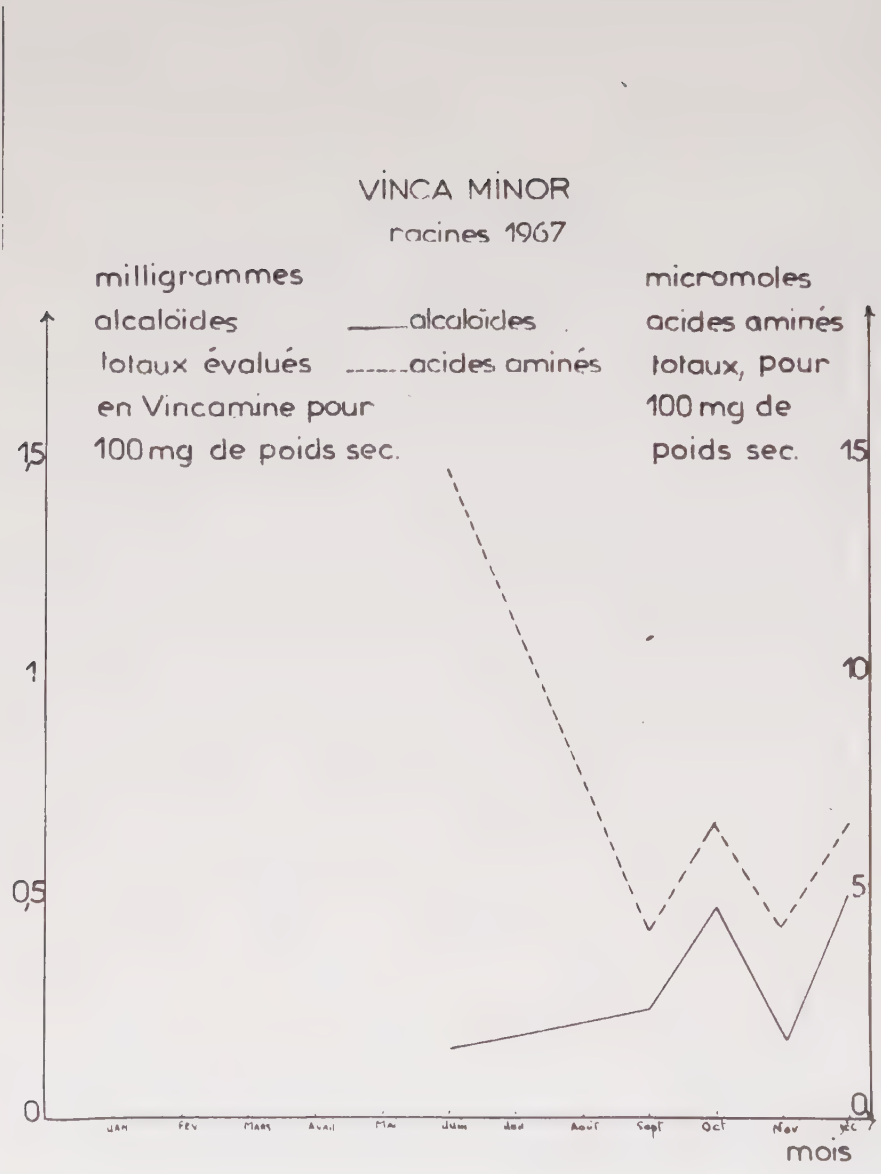
boutons floraux et fleurs 1967



VINCA MAJOR


milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine
pour 100 mg de
poids sec.
racines 1967
alcaloïdes
acides aminés.
micromoles
acides aminés
totaux pour
100 mg de
poids sec.
15
1
0,5
0
15
10
5
0
mois


VINCA MEDIA
racines 1967
milligrammes alcaloïdes totaux évalués en Vincamine pour 100 mg de poids sec.
____ alcaloïdes
____ acides aminés
micromoles acides aminés totaux pour 100 mg de poids sec.
1,5
1
0,5
0
15
10
5
0
JAN
FEV
MARS
AVRIL
MAI
JUIN
JUIL
AOÛT
SEPT
OCT
NOV
DEC


VINCA MINOR
racines 1967
milligrammes
alcaloïdes
totaux évalués
en Vincamine pour
100 mg de poids sec.
micromoles
acides aminés
totaux, pour
100 mg de
poids sec.
alcaloïdes
acides aminés
1,5
1
0,5
0
15
10
5
0
JAN
FEV
MARS
AVRIL
MAI
JUIN
JUIL
AOUT
SEPT
OCT
NOV
DEC
mois

CONCLUSIONS GENERALES

- RECOLTE ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL :

Au cours des quatre années de recherches, *nous avons dosé les acides aminés libres et les alcaloïdes dans les différents organes des Pervenches indigènes (Vinca minor L., Vinca major L., Vinca media Hoffg. et Link.) au cours de leur végétation. Toutefois les fruits et les graines n'ont pas été suffisamment étudiés, en raison d'une fructification presque inexistante de ces espèces.*

- Les récoltes *ont été réalisées à intervalles réguliers, chaque mois, toujours à la même heure, et de la même manière ; outre les boutons floraux et les fleurs, seules les extrémités des tiges et des racines ont été récoltées ainsi que les feuilles situées sur les quinze ou vingt centimètres supérieurs des tiges dressées. Les prélèvements proviennent toujours des mêmes stations.*

Les organes végétaux étaient séparés dès la récolte, séchés sous vide, à la température du laboratoire, en présence de chlorure de calcium anhydre, broyés, tamisés, et conservés au réfrigérateur en tubes bouchés.

Ce procédé, qui provoque l'inhibition des enzymes et non leur destruction, permet des études enzymologiques ultérieures.

- ETUDE QUALITATIVE DES ACIDES AMINES :

L'étude des acides aminés ne fut possible qu'après avoir éliminé les pigments des extraits végétaux. Cette dépigmentation fut difficile et de nom

breux essais furent entrepris (filtration sur Séphadex, adsorption sur acide silicique, sur talc, sur-- charbon animal, extraction par le butanol chlorhydrique, l'alcool amylique tertiaire, le chloroforme, le benzène, le méthanol).

Finalement nous avons choisi une extraction hydro-alcoolique, (éthanol à 80% v/v) (qui éliminait les protéïnes), puis une délipidation et une dépig-- mentation partielle par l'éther de pétrole.

Ensuite, une chromatographie sur colonne de charbon végétal activé permet, dans un premier éluat l'obtention des acides aminés aliphatiques purifiés, puis, après une seconde élution de la colonne, une électrophorèse préparative permet la séparation des acides aminés aromatiques et des pigments contenus--- dans cet éluat.

- D'après des essais ultérieurs de séparation des acides aminés, il nous est apparu que les techniques de chromatographie en-- couche mince semblent être surtout intéressantes pour vérifier la séparation de quelques acides aminés bien définis.

L'électrophorèse et la chromatographie bidimensionnelles sur papier permettent souvent la séparation de composés plus nombreux, et surtout le couplage de ces deux méthodes, la chromatoélectrophorèse,-- présente un pouvoir de résolution beaucoup plus poussé que celui de la seule électrophorèse ou de la seule-- chromatographie.

Nous avons utilisé un procédé basé sur ce -- principe pour inventorier les acides aminés des Pervenches. Dans un premier temps, une électrophorèse--- préparative permet de séparer les acides aminés en--- trois groupes selon leur comportement acide, neutre-- ou basique. Dans un second temps, nous séparons les acides aminés à l'intérieur de chaque groupe, au moyen

de diverses électrochromatographies, en utilisant--- différents mélanges de tampons et de solvants. En -- pulvérisant un réactif à la ninhydrine sur les chromatoélectrophorégrammes obtenus, *nous avons mis en évidence les acides aminés libres suivants dans les-- feuilles, les racines et les fleurs du Vinca major, du Vinca media et du Vinca minor : acide γ aminobutyrique, acide aspartique, acide glutamique, alanine,- arginine, asparagine, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine lysine, phénylalanine, proline,- sérine, thréonine, tyrosine, valine.*

L'asparagine, l'acide γ aminobutyrique et--- l'alanine sont en très grande quantité dans tous les organes.

La proline est presque absente des racines-- alors qu'elle se trouve en forte concentration dans- les feuilles et les boutons floraux.

La méthionine est décelable dans les fleurs- alors qu'elle est inexistante chez les feuilles et-- les racines.

La cystine et le tryptophane sont absents de tous les organes.

Ces résultats sont en accord avec ceux de--- MADAN (1967) obtenus d'après l'étude des différents- organes du *Rauwolfia serpentina* Benth.

On observe donc que les espèces de *Vinca* étudiées présentent une composition en acides aminés libres relativement homogène et que les différences ne semblent devoir s'observer qu'au niveau des variations relatives de ces divers acides au cours de la- végétation.

- ETUDE QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES :

L'étude quantitative de ces acides aminés a-- été effectuée sur des extraits obtenus selon le pro-- cessus cité précédemment.

Les dosages ont été réalisés selon les deux-- méthodes les plus employées (MOORE 1958 et PIEZ 1960) à l'aide des appareils analyseurs d'acides aminés---- Beckman et Technicon.

En comparant les résultats obtenus avec ces-- deux appareils il nous est apparu que toute technique de chromatographie d'acides aminés réalisée à 60°C--- est impropre à doser l'asparagine et surtout la gluta mine. Cet amide est en effet détruit dans une très--- large proportion au cours de son passage sur la colon ne à 60°C.

- Le dosage des acides aminés des Pervenches- indigènes n'a fait l'objet d'aucune étude avant ---- celle-ci.

Que ce soit au moyen de l'autoanalyseur Beck- man ou au moyen de l'autoanalyseur Technicon, nous a- vons trouvé des résultats semblables au cours des --- quatre années de recherche.

Seuls les pourcentages sont comparables d'une année à l'autre, les quantités réelles des acides ami nés variant selon l'ensoleillement, la nébulosité, la pluviosité, et la température moyenne de ces années.

D'autre part, l'apparition de la quantité ma- ximale d'acides aminés est toujours plus précoce chez le *Vinca major* que chez le *Vinca minor* ; l'explica--- tion de ce fait réside peut-être dans les différences écologiques des stations. L'ensoleillement du *Vinca-- major* contrastant très nettement avec l'aspect très-- ombragé de la station du *Vinca:minor*.

EN CE QUI CONCERNE LES VARIATIONS JOURNALIERES, la concentration maximale des acides aminés totaux se situe dans la soirée vers 19 H, et on note en général une diminution diurne du taux d'acide aspartique et surtout de celui d'acide glutamique.

EN CE QUI CONCERNE LES FEUILLES, la concentration maximale se situe dans les feuilles extrêmement jeunes au moment de l'apparition des boutons floraux, puis après une période de très faible anabolisme (ou de catabolisme important), généralement en Juin, une concentration relativement importante se présente à nouveau à l'époque de fructification.

Les acides aminés représentés en grande quantité sont toujours l'asparagine, l'alanine, l'acide-γ aminobutyrique et la proline, puis à un moindre degré, la valine et la glutamine, et enfin l'acide glutamique, l'acide aspartique et la tyrosine. La méthionine, la cystine et le tryptophane ne sont pas décelables.

Toutefois les variations des concentrations de deux acides sont particulières ; ce sont celles de l'acide glutamique qui a une valeur maximale très nette en décembre et celles de la proline dont la valeur maximale se situe encore plus nettement en août.

Ces variations particulières seraient dues au fait que l'acide glutamique, important en décembre, est très facilement décarboxylé en acide γ aminobutyrique au moment de la floraison.

Nous avons identifié chez les trois Pervenches la présence de la L-glutamate-1-carboxy-lyase (4. 1. 1. 15) ; cette enzyme aurait une activité moindre chez le *Rauwolfia serpentina* puisque MADAN-

(1967) signale peu d'acide γ aminobutyrique et par-- contre une grande quantité d'acide glutamique.

Les acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) intéressants à priori par - le rôle qu'on leur attribue dans la biosynthèse des- métabolites secondaires (alcaloïdes), selon les ré-- sultats d'expériences réalisées avec des précurseurs marqués, ne semblent pas avoir ici une importance--- primordiale.

La tyrosine se trouve en quantité moyenne,-- la phénylalanine en faible quantité et le tryptophane à l'état de traces quand on peut détecter sa présence.

Ce taux peu élevé de phénylalanine et cette extrême rareté du tryptophane viennent peut-être du- fait qu'ils sont, comme l'acide glutamique, utilisés au fur et à mesure de leur formation.

L'analyse in situ des processus enzymatiques pourrait peut-être apporter une contribution impor-- tante à l'étude de la chimiotaxinomie.

EN CE QUI CONCERNE LES BOUTONS FLORAUX ET--- LES FLEURS *les variations diurnes sont maximales vers le milieu de l'après-midi.*

Les acides aminés les plus importants sont-- l'asparagine, la proline et l'alanine, puis l'acide- γ aminobutyrique et la valine.

Nous avons réussi en outre à doser la méthionine qui est présente en très faible quantité.

D'autre part, les boutons fermés encore verts renferment une quantité d'acides aminés très supé--- rieurs à celle des boutons violets et des fleurs.

EN CE QUI CONCERNE LES RACINES, *les acides aminés sont en faible concentration.*

Seule l'asparagine, et à un moindre degré,--- l'acide aspartique, l'alanine, l'acide γ aminobutyrique et l'acide glutamique sont en quantité importante.

Par contre la proline est presque inexistante.

Il faut noter également ici que si l'étude--- qualitative et quantitative des acides aminés des --- feuilles et des fleurs ne laisse prévoir aucune différence entre le *Vinca minor* L., le *Vinca major* L., et le *Vinca media* Hoffg. et Link, il n'en est pas de même de celle des racines.

En effet, le *Vinca major* contient beaucoup--- moins d'arginine que le *Vinca media* et d'autre part,- la quantité maximale d'acides aminés totaux se situe- en Juin chez le *Vinca major* et en Novembre chez le--- *Vinca media.*

L'étude chimique des racines présenterait --- donc une certaine importance chimiotaxinomique alors- que celle des feuilles présenterait une importance--- quantitative certaine.

- ETUDE QUALITATIVE DES ALCALOIDES :

- Le principe de l'extraction des alcaloïdes-- est le suivant : la poudre, imprégnée par une solution d'ammoniaque, est traitée par du méthanol.

Après évaporation,l'extrait sec est repris par une solution chlorhydrique ; la solution alcaloïdique- obtenue est dépigmentée et dégraissée au moyen d'hexane, alcalinisée par addition d'ammoniaque et traitée-- par du chloroforme.

Après évaporation du solvant, l'extrait sec est repris par une quantité connue de tampon acétate de sodium à pH 4,5.

- N o t r e b u t n'était pas, évidemment, de séparer tous les alcaloïdes présents dans les organes des Pervenches sinon nous aurions suivi le processus habituel qui consiste à réaliser une chromatographie sur colonne (SVOBODA 1964) et à étudier chaque fraction obtenue par chromatographie sur papier ou en couche mince.

Nous voulions essayé de déceler des variations possibles de groupes d'alcaloïdes selon les organes et les espèces de Vinca.

Nous avons donc séparé des groupes d'alcaloïdes à partir de la solution tamponnée, précédemment obtenue, en utilisant une technique de chromatographie bidimensionnelle sur plaque de silice, inspirée des travaux de FARNSWORTH (1962).

Après des essais réalisés avec de nombreux systèmes de solvants, nous avons en effet choisi : le système de solvants préconisé par FARNSWORTH, qui consiste en un mélange de chloroforme et de méthanol à différentes concentrations.

- Selon nos résultats, les feuilles sont très riches en alcaloïdes, mais il ne nous a pas été possible de déceler des différences selon les espèces.

Les groupes d'alcaloïdes de l'Akuammine, de la Vincamine, de la Vincamajine et de la Vincamédine y ont été décelés.

L'examen des feuilles doit être disjoint de celui des autres organes, tout au moins selon nos expériences, pour essayer d'apporter une contribution à la chimiotaxinomie des Pervenches.

- L'étude des alcaloïdes des tiges montre en-effet une différence nette entre le Vinca minor d'une part et le Vinca major et le Vinca media d'autre part mais aucune différence n'apparaît entre le Vinca ma-jor et le Vinca media.

- Il en est sensiblement de même, bien qu'à-un moindre degré, dans les racines et les fleurs ; en effet, quelques différences semblent exister ici en-tre le *Vinca major* et le *Vinca media*, mais dans tous-ces organes, le *Vinca minor* diffère des deux autres-*Vinca* par l'absence du groupe de la Vincamédine.

- ETUDE QUANTITATIVE DES ALCALOIDES :

- Nous avons dosé les alcaloïdes totaux des-Pervenches sur les poudres ayant déjà servi à l'étude des acides aminés.

Il est évident en effet que si l'on veut com-parer des variations quantitatives d'acides aminés et d'alcaloïdes, il faut obligatoirement réaliser des ex tractions et des dosages simultanés sur les mêmes pou dres.

- Après de nombreuses ex-périences préliminaires, nous-avons choisi une méthode colorimétrique qui utilise-la tropéoline OO.

Il a été reconnu en effet que les méthodes-volumétriques et néphélométriques n'étaient guère -- plus souhaitables que les méthodes gravimétriques -- (KRAMARENKO 1963).

Des spectres obtenus avec les réactifs et -- les colorants indiquent que l'absorption maximale, u nique, de la coloration, est située à 545 nm., loin-de toute absorption parasite.

Le principe de cette technique est le suivant : la solution alcaloïdique tamponnée à pH 4,5 est additionnée d'une solution aqueuse saturée de tropéoline 00.

Le complexe formé est extrait au moyen de dichlorométhane et la coloration violette est obtenue par addition d'acide sulfurique en milieu méthanolique.

- Nous nous sommes référés, pour évaluer nos résultats, à une courbe étalon obtenue avec quelques milligrammes de Vincamine, extraits et purifiés par Monsieur le Professeur LE MEN.

- EN CE QUI CONCERNE LES VARIATIONS DIURNES DANS LES FEUILLES, *on observe que les alcaloïdes, comme les acides aminés, se trouvent en quantité nettement plus élevée dans la soirée.*

D'autre part, ce sont les feuilles qui renferment la plus grande quantité d'alcaloïdes.

Chez les trois Pervenches, la quantité maximale d'alcaloïdes se trouve dans les mois du printemps, au moment de la floraison, une légère recrudescence de la biosynthèse apparaissant à l'époque de la fructification.

- EN CE QUI CONCERNE LES TIGES, *les variations* diurnes et les variations saisonnières, toujours légèrement décalées dans le temps par rapport à celles des feuilles, *sont beaucoup plus fluctuantes* et ne semblent pas devoir présenter autant d'intérêt que celles des feuilles.

- IL EN EST DE MEME *des dosages réalisés sur les quelques* PRELEVEMENTS DE RACINES effectués seulement à la fin de nos travaux pour ne pas détruire prématurément nos stations.

Le fait qu'il s'agit de plantes vivaces explique peut-être cet intérêt modéré de l'étude quantitative des racines ; la translocation des principes actifs des feuilles vers les racines et leur mise en réserve n'ayant sans doute pas de raison d'être.

- EN CE QUI CONCERNE LES BOUTONS FLORAUX ET LES FLEURS, *les résultats de tous les dosages montrent que ce sont les boutons floraux fermés et encore verts qui renferment la plus grande quantité d'alcaloïdes.*

- AU POINT DE VUE DE LA CHIMIOTAXINOMIE, *des différences très nettes entre les Pervenches sont mises en évidence* par les courbes représentant nos dosages et par les courbes représentant les spectres d'absorption des extraits en solution tamponnée à pH 4,5.

Les spectres d'absorption des extraits du Vinca major et du Vinca media, en solution tamponnée à pH 4,5 *sont analogues c'est-à-dire que ces deux Pervenches renferment des alcaloïdes voisins* ayant les mêmes zones maximales d'absorption (vers 235 et 280nm), *tandis que le Vinca minor renferme les mêmes types d'alcaloïdes, mais également un autre groupe* qui absorbe vers330 nm.

D'autre part, les courbes représentant les absorptions de la coloration à la tropéoline 00 indiquent que tous les alcaloïdes du *Vinca minor* et du *Vinca major* semblent réagir avec la tropéoline 00, tandis *qu'il se pourrait que quelques alcaloïdes particuliers au Vinca media ne réagissent pas.*

De plus, les variations quantitatives des alcaloïdes dans les feuilles présentent trois valeurs importantes dans le cas du *Vinca media,* et deux seulement dans le cas du *Vinca major* et du *Vinca minor,* soit à la floraison et à la fructification.

Il y aurait donc chez le Vinca major et chez le Vinca media des mécanismes biosynthétiques, donc enzymatiques, différents, et l'on pourrait peut-être alors parler d'espèces différentes.

COMPARAISON DES DOSAGES DES ACIDES AMINES ET DES ALCALOIDES :

- Les alcaloïdes et les acides aminés subissent des variations quantitatives parallèles au cours de la végétation.

Chez les trois espèces de Pervenches, les quantités maximales d'alcaloïdes correspondent aux mêmes périodes que les quantités maximales d'acides aminés, soit au début de la floraison (au stade des boutons floraux) et à l'époque de la fructification.

Ce fait est important car il se produit aussi bien sur les plants qui fleurissent et qui fructifient que sur ceux qui restent entièrement à l'état végétatif.

D'autres auteurs (KLYSHEV 1964) rapportent de même que la quantité maximale d'acides aminés libres coïncide avec le stade bouton floral de la plante (*Papaver somniferum*), c'est-à-dire le stade de la biosynthèse intense des alcaloïdes.

De plus, ZULALIAN (1964) a démontré que le tissu primordial floral était capable d'une synthèse totale des alcaloïdes.

Ces faits semblent confirmer que les alcaloïdes sont des métabolites synthétisés dans une large mesure à partir des acides aminés et soumis à des fluctuations physiologiques analogues à celles de leurs précurseurs au cours de la végétation.

- S i l e s r é s u l t a t s d i f f é - - r e n t i e l s précédemment exposés précisent d'une certaine manière le problème taxinomique particulier- posé par le *Vinca major* et le *Vinca media* ; ce problè me ne sera résolu définitivement que par l'analyse -- des mécanismes biosynthétiques des métabolites secon- daires (alcaloïdes en particulier), et par conséquent l'étude de l'équipement enzymatique des différents or ganes et des différentes espèces, à une même époque-- physiologique.

-:-:-:-:-:-:-:-:-

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAHAM (R.J.) - (1962)
The proton resonance spectrum and structure of (méthylène cyclopropyl) glycine.
Biochem. J., 82 , *389-390.*

- AFRIKYAN (B.L.) et ARUTYUNYAN (G.S.) - (1964)
The amino acid composition of the annual rings of-- the apple tree as related to the periodicity of --- fruiting and varicus agricultural treatements.
Biokhim. Plodov. i. ovoshchéi, Akad. Nauk, S.S.S.R., Inst. Biokhim., 202-206 (d'après C.A.).

- ANDERS (K.) - (1963)
Gas chromatographic determination of amino acids ;- reduction of amino acids and amino acid derivatives with Li ALH4 and the gas chromatographic separation of the resulting amino alcohols.
Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol., 6 , *1-21 et C.A. (1965)* 63 , *11974 f.*

- ANDREEVA (T.F.) - (1960)
Formation of amino acids and proteins in plant leaves during photosynthesis.
Sibirsk. Biol. Inst., Tr. Pervoi Konf. Fiziologov i Biokhimikov, Irkutsk, 104-110. (d'après C.A.).

- ANDREEVA (T.F.) et KORZHEVA (G.F.) - (1961)
Some peculiarities of the formation of amino acids and proteins plant leaves during photosynthesis.
Fiziol. Rasten., Akad. Nauk S.S.S.R., 8 , *441-448 (d'après C.A.).*

- *Ann. Pharm. Fr., - (1961),* 19, *136-148.*

- BABCOCK (P.A.) et CAREW (D.P.) - (1962 et 1965)
Tissue culture of the Apocynaceae.
Lloydia, 25 , *209-213 et* 28 , *1-26.*

- BARDET (J.) - (1958)
Separation qualitative du glycocolle et de l'acide glutamique par chromatographie sur papier.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 49-50.

- BARTOS (J.) - (1964)
Détermination colorimétrique des acides α aminés et des amines primaires par l'acide ascorbique.
Ann. Pharm. franc., 22 , *383-385.*

- BASSHAM (J.A.) et KIRK (M.) - (1960 et 1964)
Photosynthesis of amino acids.
Biochem. Biophys. Acta, 43 , 447-464 et 90 , *553-562.*

- BATTERSBY (A.R.) et PARRY (G.V.) (1964)
Tracer studies on β-sitostérol.
Tetrahedron Letters (London) 787.

- BATTERSBY (A.R.), BROWN (R.T.), KAPIL (R.S.) KNIGHT (J.A.), MARTIN (J.A.) et PLUNKETT (A.O.) (1966).
The biosynthesis of indole alkaloids and quinine.
Chem. Commun. 23 , *888-890.*

- BATTERSBY (A.R.), BROWN (R.T.), KAPIL (R.S.), MARTIN (J.A.) et PLUNKETT (A.O.) - (1966).
Role of loganin in the biosynthesis of indole alkaloids.
Chem. Commun., 22 , *812-813 et* 23 , *890-891.*

- BAUDET (P.) et CHERBULIEZ (E.) - (1955)
Microdosage des acides α aminés et de peptides simples par l'intermédiaire de leurs sels complexes de cuivre.
Helv. Chim. Acta, 38 , *841-847.*

- BAUEROVA (O.), MOKRY (J.), KOMPIS (I.), BAUER (S.) et TOMKO (J.)- (1961)
Alkaloids form Vinca minor. II Evaluation by paper chromatography.
Chem. Zvesti., 15 , *523-528, et C.A. (1961)*, 55 , *27 389 i.*

- BENSON, Jr (J.V.), GORDON (M.J.) et PATTERSON (J.A.) (1967)
Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing glutamine and asparagine.
Anal. Biochem., 18 , *228-240.*

- BENSON, Jr (J.V.) et PATTERSON (J.A.) - (1965)
Accelerated automatic chromatographic analysis of amino acids on a spherical resin.
Anal. Chem., 37 , *1108-1110.*

- BIEMANN (K.), DEFFNER (G.G.J.) et STEWARD (F.C.) (1961)
Determination by mass spectrometry of the structure of proline derivatives from apples.
Nature, 191, *380-381.*

- BIEMANN (K.), LIORET (C.), ASSELINEAU (J.), LEDERER (E.) et POLONOVSKY (J.) (1960)
Biochim. Biophys. Acta., 40 , *369-370.*

- BISERTE (G.), BOULANGER (P.) et PAYSANT (P.) (1958)
Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des milieux biologiques. VI. Tissus normaux et pathologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 40 , *2067-2089.*

- BISERTE (G.) et DAUTREVAUX (M.) - (1963)
Données récentes sur les séparations chromatographiques et électrophorétiques des acides aminés et des peptides.
Prod. Probl. Pharm., 18 , *373-385.*

- BISERTE (G.) DAUTREVAUX (M.) et BOULANGER (P.) (1963)
La chromato-électrophorèse des acides aminés et des peptides.
Bull. Soc. Chim. France, 12 , 2954-2959.

- BISERTE (G.) PLAQUET (Th.), BOULANGER (P.) et PAYSANT (P.) - (1960)
J. Chromatog., 3 , *25.*

- BLACKBURN (S.) - (1965)
The determination of amino acids by high-voltage papier electrophoresis.
Methods Biochem. Anal., 13 , *1-45.*

- BLAEDEL (W.J.) et EVENSON (M.A.) - (1964)
A continuous isotope derivative procedure with direct readout for amino acids.
Radiochem. Methods Anal. Proc. symp., Salzburg, Austria, 2 , *371-387*.

- BLAU (K.) et DARBRE (A.) - (1965)
Gas chromatography of volatile amino acid derivatives.
J. Chromatog., 17 , *445-449*.

- BLOCK (R.), DURRUM (E.) et ZWEIG (G.) - (1956)
A manual of paper chromatography and paper elec trophoresis,
Academic Press.

- BOCHAROVA (D.A.) - (1960)
Alkaloid content in Vinca herbacea at different stages of its vegetation.
Aptechn. Delo., 9 , *35-39 (d'après C.A.)*.

- BODER (C.B.), GORMAN (M.), JOHNSON (J.S.) et SIMPSON (P.J.) - (1964)
Tissue culture studies of Catharanthus roseus crown gall.
Lloydia, 27 , *328-333*.

- BONNAFE (M.) - (1963 et 1964)
"Methodes d'analyse automatique".
Symp. Technicon, Paris.

- BONNAFE (M.) - (1965)
Nouveaux développements dans la chromatographie automatique des acides aminés et des peptides et l'hydrolyse automatique des peptides.
J. Pharm. Belgique., 5-6 , *193-197*.

- BONNAFE (M.) - (1965)
Technique Pharmaceutique, 12.

- BONNAFE (M.) (1965)
Symp. int. Technicon, Paris.

- BONNAFE (M.) - (1966)
Technicon informations, 10 , *24.*

- BOUILLET (H.M.) - (1965)
Technicon informations, 7 , *8.*

- BOULANGER (P.) et BISERTE (G.) - (1951)
Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques. II. Modifications techniques et résultats nouveaux (plasma sanguin).
Bull. Soc. Chim. Biol., 33 , *1930-1939.*

- BOULTER (D.) - (1966)
An introduction to automatic amino acid analysis with plant extracts.
Techniques in amino acid analysis.
Technicon monograph n° 1, 93-107.

- BOULTER (D.) et BARBER (J.T.) - (1963)
Amino acid metabolism in germinating seeds of Vicia faba in relation to their biology.
New. Phytologist., 62 , *301-316.*

- BOULTON (A.A.) et BUSH (I.E.) - (1964)
Qualitative and quantitative analysis of amino acids as their "dansyl" derivatives.
Biochem. J., 92 , *11P-12P.*

- BRAUN (L.) - (1963)
Biochem. Z., 339 , *8-12*.

- BRENNER (M.) - (1960)
Pureté et analyse des amino-acides.
Amino acids, Pept., Prot., 4 , *17-38*.

- BRENNER (M.) et NIEDER WIESER (A.) - (1960)
Dünnschicht Chromatographic von Aminosaüren.
Expérientia, 16 , *378-383*.

- BRENNER (M.), NIEDERWIESER (A.) et PATAKI (G.) (1964)
Charactérisation of protein hydrolyzates and amino acids in biological materials by thin-layer chromatography.
New Biochem. Separations, 123-156.

- BRONISLAW Gej. - (1963)
New, sc-called free, plant amino acids.
Kosmos, ser. A, 12 , *241-247 (d'après C.A.)*.

- BURGI (W.) - (1965)
J. suisse Pharm., 103 , *351-354*.

- BURNS (J.A.), CURTIS (C.F.) et KAESER (H.) - (1965)
A method for the production of a desired buffer gradient and its use for the chromatographic separation of arginino-succinate.
J. Chromatog., 20 , *310-318*.

- CATRAVAS (G.N.) - (1964)
Automatic for separation, hydrolysis, and detection of peptides.
Anal. Chem., 36 , *1146-1148*.

- CATRAVAS (G.N.) - (1965)
Accelerated chromatography of physiological fluids.
Technicon symposium, "Automation in Analytical chemistry" New-York.

- CIRCO (E.), et FREEMAN (B.A.) - (1963)
Diéthylamine-ninhydrin as a color test aid in identification of amino acids on paper chromatograms.
Anal. Chem., 35 , *262-263.*

- CODERN (L.), CADEA (J.), GAL (E.) et MONTAGUT (M.) (1963)
Chromatografia en capa fina de aminoacides.
Afinidad, 20 , *159-161. (d'après C.A.).*

- COLLET (G.), DUBOUCHET (J.) et PILLET (P.E.) (1964)
Physiol. Veg., 2 , *157-194.*

- CONE (N.J.), MILLER (R.) et NEUSS (N.) - (1963)
Alkaliids of Vinca rosea Linn. (Catharanthus roseus G. Don).
XV. Analysis of Vinca Alkaloids by Thin-Layer chromatography.
J. Pharm. Sc., 52 , *688-692.*

- CORFIELD (M.C.) et ROBSON (A.) - (1961)
Automatic analysis of amino acids by polarographic estimation of their cooper complexes.
Biochem. J., 80 , *37P.*

- CORMIER (M.) et GIRRE (L.) - (1967)
Emploi de techniques automatiques dans l'étude des acides aminés des plantes médicinales.
Plantes médicinales et Phytothérapie, 1 , *15-22.*

- CRUICKSJANK (P.A.) et SHEEHAN (J.C.) - (1964)
Gas chromatographic analysis of amino acids as N-trifluoro-acétamido acid méthyl esters.
Anal. Chem., 36 , *1191-1197.*

- DELARUE (J.C.) - (1966)
Bull. Soc. Chim. Biol., 48.

- DELLACHA (J.M.) et FONTANIVE (A.V.) - (1965)
N-terminal amino acid analysis by thin-layer chromatography.
Experientia, 21 , *351-352.*

- DEMOLE (E.) - (1961)
Progrès récents de la microchromatographie sur couches minces.
J. Chromatog., 6 , *2-21.*

- DILOV (C.)et GEORGIEV (D.) - (1959)
C.R. Acad. Bulg. Sci., 12 , *227-230. (d'après C.A.).*

- EDREVA-KANDOVA (A.) et MITEV (D.) - (1964)
The free amino acids and those combined in the proteins of Cyperus esculentus grown in Bulfaria.
C.R. Acad. Bulgare Sci., 17 , *167-169. (d'après C.A.).*

- EFRON (M.L.) - (1965)
Quantitative estimation of amino acids in physiological fluids using a Technicon amino acid analyser.
Symp. Technicon, New-York.

- EL-KHADEM (H.S.), EL-SHAFEI (Z.M.) et ABDEL RAHMAN (M.M.A.) - (1963)
Solvents for the paper chromatography of amino acids and sugars without spraying.
Anal. Chem., 35 , *1766-1766.*

- ELWYN (D.H.) - (1964)
Continuous scintillation counting of amino acid analyzer column eluates.
Atomlight, 37, *5-12*.

- ESSER (K.) - (1965)
Determination of microamounts of amino acids and amino sugars by thin-layer chromatography.
J. Chromatog., 18 , *414-416*.

- FARNSWORTH (N.R.) - (1961)
The pharmacognosy of the periwinkles : Vinca and Catharanthus Lloydia, 24 , *105-138*.

- FARNSWORTH (N.R.), FONG (H.H.S.), BLOMSTER (R.N.) et DRAUS (F.J.) - (1962).
Studies on Vinca major. II. Phytochemical investigation.
J. Pharm. Sc., 51 , *217-224*.

- FAUGERAS (G.) et PARIS (R.) - (1965)
Chimiotaxinomie des Papillonacées-Génistées.
Bull. Soc. Bot. Fr., (Mémoires), *75-102*.

- FAZAKERLEY (S.) et BEST (D.R.) - (1965)
Séparation of amino-acids as copper chelates, from amino-acid, protein, and peptides mixtures.
Anal. Biochem., 12 , *290-295*.

- FESSLER (J.H.) et GALLEY (H.) - (1964)
Thin-layer chromatography of relatively voluminous samples.
Nature, 201 , *1056-1056*.

- FOXDEN (L.) - (1959)
Ann. Rept. Prog. Chem., 56 , *359-372.*

- FOWDEN (L.) - (1962)
Les acides aminés non protidiques des végétaux.
Endeavour, 21 , *35-42.*

- FOWDEN (L.) - (1964)
The chemistry and metabolism of recently isolated amino acids.
Ann. Rev. Biochem., 33 , *173-204.*

- FOWDEN (L.), NOE (F.F.), RIDD (J.H.) et WHITE (R.F.M.) (1959)
The nuclear magnetic resonance spectrum of a new plant amino acid ;
Evidence for a Pyrazole ring.
Proc. Chem. Soc. 131-132.

- FRASER (R.D.B.), JUGLIS (A.S.) et MILLER (A.) (1964)
Anal. Biochem., 7 , *247-251.*

- FRODYMA (M.M.) et FREI (R.W.) - (1965)
An improved method for the determination of amino acids by spectral reflectance.
J. Chromatog., 17 , *131-139.*

- FUKUDA (T.) - (1963)
Composition of wood. I Amino acids of wood.
Nippon Mokusai gakkaiski, 9 , *166-170. (d'après C.A.)*

- GAUTIER (J.A.) et BLANC-GUENEE (J.) - (1962)
"Chromatograph symp. II. Bruxelles".

- GAUTHIER (B.) et MARECHAL (M.C.) - (1962)
Détermination des acides aminés par complexométrie cuivrique.
Ann. Pharm. Fr., 20 , *156-162.*

- GEHRKE (C.W.), LAMKIN (W.M.), STALLING (D.L.) et SHAHROKHI (F.) - (1965)
Quantitative gas chromatography of amino acids.
Biochem..Biophys. Res. Commun., 19 , *328-334.*

- GONZALES.CADAIRD (N.) et PALADINI (A.C.) - (1964)
Automatic amino acid analysis : reagent and instrumental improvements.
Anal. Biochem., 9 , *170-174.*

- GOSSET (J.) - (1963)
Thèse Doct. Sc. Phys. Paris.

- GOSSET (J.), LE MEN (J.) et JANOT (M.M.) - (1962)
Alcaloïdes des Pervenches. XX. Isolement de 1'Akuammidine et d'un nouvel alcaloïde, Vinca difformine, des feuilles du Vinca difformis.
Ann. Pharm. Franc., 20 , *448-454.*

- GRAHAM (G.N.) et SHELDRICK (B.)- (1965)
A computer program for the calculation of the results of amino acid analysis.
Biochem. J., 96 , *517-520.*

- GRAHAM (H.D.) et THOMAS (L.B.) - (1961)
Color reaction of alkaloids with dichromate-sulfuric acid and its use for quantitative assay.
J. Pharm. Sci., 50 , *901-904.*

- GRAY (D.O.) et FOWDEN (L.) - (1962)
4-méthylène proline : a new naturally occuring proline derivative.
Nature, 193 , *1285-1286*.

- GIL-AV (E.), CHARLES (R.) et FISCHER (G.) - (1965).
Resolution of amino acids by gas-chromatography.
J. Chromatog., 17 , *408-410*.

- GROEGER (D.) et STOLLE (K.) - (1965)
Analysis of certain Catharanthus roseus alkaloïds.
Arch. Pharm., 298 , *246-252*.

- GROEGER (D.), STOLLE (K.) et MOTHES (K.) - (1964)
Biosynthesis of varioús alkaloids from Catharanthus roseus.
Tetrahedron letters, 39 , *2579-2586*.

- HAJKOVA (I.) et HOMOLA (V.) - (1961 et 1962)
Beitrag zur Auswertung von Inhaltsstoffen der Vinca minor L.
Acta. Fac. Pharm. Bohemoslovenicae, 4 , *39-48* *et* 4 , *39-51*.

- HAJKOVA (J.) HOMOLA (V.) et NAVRATIL (L.) - (1959)
Bestimmung einiger Inhalsstoffe von Vinca minor L. während der Vegetationszeit.
Pharmacie, 14 , *537-540*.

- HAJKOVA (I.) et SKACILIKOVA (J.) - (1961)
Bestimmung einiger Inhalsstoffe von Vinca minor L. in einzelnen Pflanzenorganen.
Pharmacie, 16 , *102-103*.

- HALASZ (I.) et BUENNING (K.) - (1965)
Preparation of alkyl esters of N-trifluoroacetylamino acids for gas chromatographic separations in capillary columms.
Z. Anal. Chem., 211 , *165.*

- HALPERN (B.) et WESTLEY (J.W.) - (1965)
High sensitivity optical resolution of Dl-amino acids by gas chromatography.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 19 , *361-363.*

- HAMBRAEUS (L.) - (1963)
Svensk Kem. T., 75 ; *638-648. (d'après C.A.).*

- HAMBRAEUS (L.) - (1963)
A modified automatic amino-acid analyzer.
Sci. Tolls, Sweden, 10 , *39-45 (d'après C.A.).*

- HAMILTON (P.B.) - (1963)
Ion exchange chromatography of amino acids.
A single column, high resolving, fully automatic procedure.
Anal. Chem., 35 , *2055-2064.*

- HAMILTON (P.B.) - (1965)
Feder. Proc., 24 , *656.*

- HAMILTON (P.B.) - (1966)
Ion exchange chromatography of amino acids : Technical problems in submicrodetermination.
Techniques in amino acid analysis, Technicon monograph n° 1, 17-25.

- HARRIS (A.L.), NYLUND (H.B.) et CAREW (D.P.) (1964)
Tissue culture studies of certain members of the Apocynacéae.
LLoydia, 27 , *322-327.*

- HARTEL (J.), COPPER (J.A.) et VAN BOCHOVE (C.) (1963)
Séparation of amino acids on ion exchange paper.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 82, *264-274.*

- HEGNAUER (R.) - (1958)
Planta medica, 1 , *12 et* 6 , *1.*

- HILL (J.B.), SUMMER (G.K.), PEUDER (M.W.) et ROSZEL (M.O.) - (1964)
Symp. Int. Technicon, New-York.

- HOCHSTRASSER (J.) - (1966)
Colour Reagents.
Techniques in amino acid analysis.
Technicon monograph n° 1, 127-133.

- HOFSTRA (J.J.) - (1964)
Amino acids in the bleeding sap of fruiting tomato plants.
Acta botan. Neerl., 13 , *148-158. (d'après C.A.).*

- HORI (M.) et AOKI (I.) - (1966)
Jap. Analyst., 15 , *3-9. (d'après C.A.).*

- HULTIN (E.) - (1965)
Acta Chem. Scand., 19 , *588-590. (d'après C.A.).*

- INAGAKI (I.), NISHIBE (S.) et TOKUHIRO (T.) (1964)
Nagoya Shiritsu Daigaku Yakugakubu Kenkyu Nempo, 12 , *38-41 et C.A. (1966)*, 64 , *20 168 g.*

- JACOBS (S.) - (1963)
The chromatographic analysis of amino acids on ion exchange resins.
Lab. Pract., 12 , *557-563.*

- JACOBS (S.) - (1963)
An improved system for the determination of amino acids in protein hydrolysates.
Biochem. J., 87 , *30P.*

- JACOVLJEVIC (I.M.) - (1962)
Colorimetric method for the determination of vinblastine, an alkaloid from Vinca rosea. I.
J. Pharm. Sci., 51 , *187-188.*

- JANOT (M.M.), LE MEN (J.) et GARNIER (J.) - (1965)
Chimiotaxinomie des Pervenches.
Bull. Soc. Bot. de France, Mémpires, 117-124.

- JOUAN et CIRRE (L.) - (1965)
Cuves pour chromato-ionophorèse.
Bull. Soc. Sci. Bretagne, 40 , *187-192.*

- JOUAN (P.) - (1956)
Contribution à l'étude du métabolisme tissulaire de la L-3-5-3' triiodothyronine.
Thèse Doct. Pharm. (Etat), Marseille.

- JOVANOVICS (K.), MARK (G.), HOROMPO (L.) et SZASZ (K.) - (1964)
The cytostatic principles of Vinca rosea.
Acta Pharm. Hung., 34 , *36-41. (d'après C.A.).*

- JUTISZ (M.) - (1960)
"La chromatographie en chimie organique et biologique".
(Sous la direction de E. Lederer), Masson Paris.

- JUTISZ (M.) et de LA LLOSA (P.) - (1963)
Récentes acquisitions dans le domaine de la chromatographie des amino-acides.
Bull. Soc. Chim. France, 12 , *2913-2923.*

- JUTISZ (M.) et LEDERER (E.) - (1947)
Nature, 159 , *445.*

- KACZMAREK (F.) et LUTOMSKI (J.) - (1962)
Analysis of the alkaloids of Vinca minor.
Biul. inst. Roslin. Leczniczych, 8 , *1-11.*
(d'après C.A.).

- KANIUGA (Z.) - (1959)
Postepy Biochem., 5 , *335-364. (d'après C.A.).*

- KARMEN (A.) et SAROFF (H.A.) - (1964)
Gas-liquid chromatography of the amino-acids.
Naw Biochem. Separations, 1-24.

- KATO (M.) - (1957)
Kagaku no Ryoiki, 11 , *767-775. (d'après C.A.).*

- KING, Jr (J.S.) - (1964)
Clin. Chim. Acta, 9 , *441*.

- KIEKPATRICK (C.H.) et ANDERSON (R.A.) - (1964)
A modified method for the separation of basic amino acids on the automatic amino acid analyzer.
J. Chromatog., 14 , *285-297*.

- KIRSTEN (E.) et KIRSTEN (R.) - (1964)
Biochem. Z., 339 , *287-304*.

- KLYSHEV (L.K.) et KORDAKOV (I.A.) - (1964)
Dynamics of free amino acids in opium poppy during growth, and the biosynthesis of alkaloids.
Vestn. Akad. Nauk Kaz. SSR, 20 , *71-76 (d'après C.A.)*.

- KRAMARENKO (V.P.) - (1963)
Determination of alkaloids in biological material.
Farmatsevt., 18 , *65-70. (d'après C.A.)*.

- KRETOVITCH (V.L.) et KASPEREK (M.S.) - (1962)
Biosynthesis of amino acids from pyruvic acid and ammonia in rice and sunflowers.
Fiziol. Rast., 8 , *533-536. (d'après C.A.)*.

- KRICHEVSKY (M.I.), SCHWARTZ (J.) et MACE (M.) - (1965)
Automatic digital data acquisition and computer calculation in amino acid analysis.
Anal. Biochem., 12 , *94-105*.

- KRISHNASWAMY (P.R.), RAJAGOPAL RAO (D.) et ANANTHASWAMY (H.N.) - (1965).
Rosen's ninhydrin method for amino acid analysis.
Anal. Biochem., 11 , *582-584*.

- LAIN (E.R.), RODRIGUEZ (E.S.) et CRISTOBAL (J.R.) (1966)
Ann. Bromatol., 18 , *105-110.*

- LARSEN (P.O.) et KJAER (A.) - (1960)
Kemisk, 41 ; *65-70. (d'après C.A.).*

- LATINER (R.A.) - (1962)
Comparison of analytical methods for the determination of amino acid.
Recent Progr. Microbiol. Symp. 8th internation congr. Microbiol. Montréal.

- LEETE (E.), AHMAD (A.) et KOMPIS (I.) - (1965)
Biosynthesis of the Vinca alkaloids I. Feeding experiments with tryptophan - 2 - 14 C and acetate - 1 - 14 C.
J. Am. Chem. Soc., 87 , *4168-4174.*

- LEETE (E.) et UEDA (S.) - (1966)
Biosynthesis of the Vinca Alkaloids. The incorporation of geraniol-3-14 C into catharanthus and vindo line.
Tetrahedron Letters, 40 , *4915-4918.*

- LEVY (A.L.) et CHUNG (D.) - (1953)
Anal. Chem., 25 , *396.*

- LIORET (C.) - (1964)
Bull. Soc. Franc. Physiol. Veg., 10 , *116-119.*

- LONDON (D.R.) - (1966)
The preparation and analysis of biological fluids for amino acid chromatography and for α amino nitrogen.
Techniques in amino acid analysis.
Technicon monograph n° 1, 38-42.

- LORINCZ (C.) - (1961)
The rapid microdetermination the active ingredients in drugs.
Magyar Kem. Folyoirat, 68 , *414-415. (d'après C.A.).*

- LORINCZ (C.) et SZASZ (K.) - (1961)
The alkaoids of Vinca minor. III. Determination of Vincamine by means of amphi-indicators.
Acta Pharm. Hung., 31 , *106-112. (d'après C.A.).*

- LYAPUNOVA (P.N.) - (1964)
A study of the alkaloid constituents of Vinca minor growing int the Ukraine.
Izuch. i Ispol'z. Lekarstv. Rastit. Resurvov. SSR, 255-257 et C.A., 1965, 63 , *922 g.*

- MADAN (C.L.) - (1967)
Paper chromatographic study of the free and bound amino acids in Rauwolfia serpentina Benth.
Planta medica, 15 , *118-120.*

- MANUSADZHYAN (V.G.) - (1965)
Application of mass spectroscopy in biology and biochemistry.
Izv. Akad. Nauk. Arm. SSR., Biol. Nauki, 18 , *69-78. (d'après C.A.).*

- MARCUCCI (F.), MUSSINI (E.), POY (F.) et GAGLIANDI (P.) - (1965)
Separation of amino acids as their N-trifluoroacetyl butyl esters by gas chromatography.
J. Chromatog, 18 , *487-491.*

- MARKIEWICZ (L.) - (1964)
Comparative determinations of alkaloid content of the roots of Vinca rosea.
Dissertations Pharm., 16 , *207-211.*

- MARTIN KAPLAN (J.) et SCHNEIDER (F.L.) - (1962)
Electrochromatographic separation of amino acids.
Microchemical Journ., 6 , *557-560.*

- MASON (W.B.) - (1965)
A report of the 18 th annual analytical chemistry summer symposium.
Anal. Chem., 37 , *1755-1758.*

- MASTROPIETRO-CANCELLIERI (M.F.) et MORPURGO (G.) (1963)
New microbiological method for determination of amino acids.
Sci. Rept. Ist. Sper. Sanita, 2 , *336-344 (d'après C.A.).*

- MIETTINEN (J.K.) - (1955)
Suomen Kemistilehti, Ser. A., 28 , *9-24 (d'après C.A.).*

- MOFFAT (E.D.) et LYTLE (R.I.) - (1959)
Polychromatic technique for the identification of amino acids on paper chromatograms.
Anal. Chem., 31 , *926-928.*

- MOHAN DAS (J.) - (1965)
Free amino acids and carotenes in the leaves of Moringa oleifera.
Curr. Sci., 34 , *374-375. (d'après C.A.).*

- MOHRSCHULZ (W.) - (1960)
Microdetermination of alkaloids and similar substances in tablets, coated tablets, and pills by using the tropeolin method of Häussler.
Deut. Apotheker-Ztg., 100 , *36-39.*

- MONEY (T.), WRIGHT (I.G.), MC CAPRA (F.) et SCOTT (A.I.) - (1965)
Biosynthesis of the indole alkaloids.
Proc. Natl. acad. Sci. U.S., 53 , *901-903.*

- MONSIGNY (M.) - (1965)
Symp. int. Technicon, Paris.

- MONTANT (C.) - (1956)
Etude et distribution des acides aminés chez Euphorbia characias L.
Les acides aminés des feuilles et du latex.
C.R. Séances Soc. Biol. Toulouse, 150 , *440 et 1465.*

- MONTANT (C.) - (1957)
Les acides aminés libres des Euphorbes.
C.R. Acad. Sci., 245 , *1454-1455.*

- MONTANT (Ch.)et TOUZE-SOULET (J.M.) - (1960)
Electrophorèse sur poudre de cellulose des acides aminés.
Bull. Soc. Chim. Biol., 42 , *161-166.*

- MOORE (S.) et STEIN (W.H.) - (1954)
J. Biol. Chem., 211 , *893-906 et 907-913.*

- MOORE (S.), SPACKMAN (D.H.) et STEIN (W.H.) - (1958)
Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrène resins.
Anal. Chem., 30 , 1185-1190.

- MOORE (A.W.) - (1964)
Comparison of three methods of assay of amino acids in barley grain.
Agrochimica, 9 , *75-79 et C.A. 1965,* 63 , *2101.*

- MORGUNOVA (E.A.), EVSTIGNEEVA (Z.G.) et KRETOVICH (V.L.) - (1964)
Biosynthesis of amino acids from glyoxylic acid in oil-bearing plants.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 156 , *467-470 (d'après C.A.).*

- MOROZOVA (R.P.) - (1965)
New reactions for detecting and identifying amino acids on chromatograms.
Ukr. Biokhim. Z., 37 , *290-299*, 63 , *3294.*

- MOTHES (K.) - (1964)
Problems of chemical taxonomy of plants.
Probl. Evolyntsionnoi i Tekhn. Biochim. Akad. Nauk SSSR, *Inst. Biokhim., 176-181. (d'après C.A.).*

- MUNIER (R.L.) et SARRAZIN (G.) - (1965)
Chromatographie en couche mince des amino acides de grande mobilité (isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine).
Bull. Soc. Chim., 5 , *1490-1491.*

- MURAI (A.) et TACHIKAVA (Y.) - (1964)
The use of acids as stationary phase in gas chromatography.
Part. I. monosodium L-glutamate.
J. Chromatog., 14 , *100-103.*

- MUSHA (S.) et OCHI (H.) - (1965)
Separation of amino acids by circular thin-layer chromatography.
Jap. Analyst., 14 , *202-207. (d'après C.A.).*

- MUTSCHLER (E.) et ROCHELMEYER (H.) - (1959)
Uber die Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Dünnschicht chromatographie.
Arch. der Pharmazie, 8/9 , *449-452.*

- NGUYEN HIEP - (1966)
Contribution à l'étude de la dessiccation des plantes médicinales.
Thèse Doct. Pharm. (Etat). Paris.

- NOFRE (C.), COPPER (J.A.) et VAN BOCHOVE (C.) (1963)
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 82 , *264-274. (d'après C.A.).*

- NOGUCHI (M.), YAMAMOTO (K.) et TAMAKI (E.) (1964)
Nitrogen metabolism in tobacco plants. A.V. changes of the free amino acid composition of tobacco leaves with age.
Tobacco Sci., 8 , *8-12 (d'après C.A.).*

- NYBOM (H.) - (1964)
Amino acids analysis by means of thin layer electrophoresis combined with chromatography.
Physiol. Plant., 17 , *434-442.*

- OPIENSKA-BLAUTH (J.), CHAREZINSKI (M.), SANECKA (M.) et BRUSKIEWICZ (H.) - (1962)
Losses of tryptophan during chromatographic analysis.
J. Chromatog., 7 , *321-328.*

- ORESKES (I.), CANTOR (F.) et KUPFER (S.) (1965)
Anal. Chem., *37.*

- PADIEU (P.) et MALEKNIA (N.) - (1965)
Un nouveau système de tampons volatils pour la chromatographie des acides aminés sur résine échangeuse de cations.
Bull. Soc. Chim. Biol., 47 , *493-504.*

- PADIEU (P.) et MALEKNIA (N.) - (1966)
Symp. int. Technicon, Paris.

- PADIEU (P.), MALEKNIA (N.) et SCHAPIRA (G.) (1964)
Symp. int. Technicon, Paris.

- PADIEU (P.), MALEKNIA (N.) et THIREAU (A.M.-) (1963)
L'emploi de tampons volatils en chromatographie sur colonne d'échangeur d'ions.
Bull. Soc. Chim. France, 12 , *2960-2964.*

- PARIS (R.) et DELAVEAU (P.) - (1965)
Possibilités et limites de la chimiotaxinomie.
Bull. Soc. Bot. France, Mémmoires, 143-149.

- PARIS (R.) et MOYSE (H.) - (1957)
Les Pervenches indigènes et exotiques. Etude botanique.
Journ. Agr. Trop. et de Bot. Appl., 4 , *481-489.*

- PARIS (R.) et MOYSE (H.) - (1957)
Les pervenches indigènes et exotiques. II - Etude chimique.
Journ. Agr. Trop. et de Bot. Appl., 4 , *645-656.*

- PARIS (R.) et MOYSE (H.) - (1958)
Les pervenches indigènes et exotiques. III - Etude pharmacologique.
Journ. Agr. Trop. et de Bot. Appl., 5 , *35-43.*

- PASTOR (J.) - (1965)
Bull. Soc. Pharm. Marseille, 14 , *91-102.*

- PATAKI (G.) - (1965)
Effect of the quality of the layer on the separation of amino acids by thin-layer chromatography.
J. Chromatog., 17 , *580-584.*

- PETERSON (E.A.) et SOBER (H.A.) - (1959)
Variable gradient device for chromatography.
Anal. Chem., 31 , *852-857.*

- PICHON (M.) - (1948)
Classification des Apocynacées.
Mém. Mus. Hist. Nat. Paris, 27 , *153-252.*

- PIEZ (K.A.) et MORRIS (L.) - (1960)
A modified procedure for the automatic analysis of amino acids.
Anal. Biochem., 1 , *187-201.*

- PLAT (M.) - (1963)
Alcaloïdes de l'Anmsonia Tabernaelontana Walt. et du Vinca minor L.
Thèse Doct. Sc. Nat. Paris.

- PLAT (M.), LEMAY (R.), LE MEN (J.), JANOT (M.M.), DJERASSI (C.) et BUDZIKIEWICZ (H.) - (1965)
Alcaloïdes nouveaux du Vinca major L. (Apocynacées) ; Alcaloïdes des Pervenches (32é note).
Bull. Soc. Chim. France, 9 , *2497-2501.*

- PLESHKOV (B.P.) - (1961)
Izv. Timiryazev. Sel' skokhoz Akad, 6 ; *17-31.*
(d'après C.A.).

- PLUSCHKAT (H.) - (1964)
Microbiological amino acid determination in peptones.
Pharmazie, 19 , *270-273.*

- POISSON (J.) - (1961)
La biosynthèse des alcaloïdes indoliques.
Bull. Soc. Fr. Phys. Véget., 7 , *36-42.*

- POISSON (J.) - (1965)
Chimiotaxinomie des Rauwolfia.
Bull. Soc. Bot. de France, Mémoires, 162-175.

- PORATH (J.) - (1960)
Biochem. Biophys. Acta, 39 , *193-207.*

- PORTER (W.L.) et TALLEY (E.A.) - (1964)
Digitizer for application of computers to automatic amino acid analysis.
Anal. Chem., 36 , *1692-1693.*

- POTTEAU (B.) - (1965)
L'analyse des acides aminés et des petits peptides sous la forme de dérivés volatils.
Applications récentes de la chromatographie en phase gazeuse.
Bull. Soc. Chim. France, 12 , *3747-3756.*

- PRZYBYLSKA (J.) - (1963)
Postepy Biochem., 9 , *105-127. (d'après C.A.).*

- RATNER (E.I.) et UKHINA (S.F.) - (1965)
Sur quelques particularités du métabolisme azoté dans les racines de quelques végétaux, sur l'exemple dans l'assimilation d'acides aminés exogènes.
Fiziol. Rasten. SSSR, 12 , *814-824. (d'après C.A.).*

- RICHTER (I.), STOLLE (K.), GROEGER (D.) et MOTHES (K.) - (1965)
Synthesis of alkaloids in tissue cultures of Vinca roseus.
Naturwissenchaften, 52 , *305-306.*

- ROBIN (P.), ROBIN (D.), JACQUOT (R.) - (1967)
Submicrodétermination des amino acides.
Colloque sur la chromatographie. Technicon, Paris.

- ROSSETTI (V.) - (1964)
A multiple spraying method for thin-layer chromatography of amino acids.
Biochem. Appl., 11 , *225-230 et C.A. (1965)*, 63 , *4633.*

- RUBIN (B.A.) - (1963)
Present conception of the role of the root system in live processus of the plant organism.
Vestn. Sel'skokhoz. Nauki., Vses. Akad. Sel'skokhoz. Nauk, 8 , *7-17 (d'après C.A.).*

- SAFARIK (L.) - (1966)
Titrations in nonaqueous solvents in pharmaceutical analysis. XIV. Microdetermination of alkaloids in Tablets.
Cesk. Farm., 15 , *360-362. (d'après C.A.)*

- SALJAEV (R.K.) - (1961)
Méthode rapide de détermination histochimique des acides aminés libres sur matériel végétal.
Bot. zh. SSSR, 46 , *1144-1145 (d'après C.A.).*

- SATAKE (K.), OKUYAMA (T.), OHASHI (M.) et SHINODA (T.) - (1960)
J. Biochem., 47 , *654.*

- SCHORMUELLER (J.) et STAN (H.J.) - (1965)
Continuous measurement of mixtures of 14C - labeled amino acids with a scintillator after separation on ion exchange columus.
Z. Anal. Chem., 211 , *274-281.*

- SCHWERDFEGER (E.) - (1965)
Angew. Chem., 77 , *1039-1040.*

- SEBEK (O.K.) - (1965)
Microbiological method for the determination of L-tryptophan.
J. Bactériol., 90 , *1026-1031.*

- SHLYAPNIKOV (S.V.) et KARPEISKII (M. Ya) - (1965)
Gas chromatographic separation of the esters of N-acetyl amino acids by means of polar stationary phases.
Biokhimiya, 30 , *226-234 et C.A. (1965)*, 63 , *3029.*

- SOBICZEWSKA (M.) - (1964)
Alkaloid determination in vegetable material with p-toluene sulfonic acid in nonaqueous medium.
Acta Polon., Pharm., 21 , *485-488. (d'après C.A.).*

- SPACKMAN (D.H.) - (1963)
Accelerated system for the automatic analysis for amino acids.
Fred. Proc., 22 , *244.*

- SPACKMAN (D.H.) - (1964)
Ion exchange chromatography of protein hydrolyzates. I. Automatic amino acid analyzer and accelerated procedures.
Serum Proteins Dysproteinemias, 166-173. et C.A. (1965), 63 , *7332.*

- SPACKMAN (D.H.), STEIN (W.H.) et MOORE (S.) (1958)
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Anal. Chem., 30 , *1190-1206.*

- STAINER (M.) - (1966)
Ann. Pharm. Fr., 24 , *221-234.*

- STALLING (D.L.) et GEHRKE (C.W.) - (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 22 , *329.*

- STANLEY (T.W.) et SAWICKI (E.) - (1965)
Spectrophotometric analysis of non fluorescent compounds on paper and thin-layer chromatograms.
Anal. Chem., 37 , *938-940.*

- STEGER (H.) et STORZ (A.) - (1961)
Microanalytical determination of alkaloids by silicomolybdic acid.
Pharmazie, 16 , *126-127.*

- STEIN (W.H.) et MOORE (S.) - (1950)
Sold spring harbour symposia on quantitative biology, 14 , *179.*

- STEWARD (F.C.) et DURZAN (D.J.) - (1965)
Metabolisme of Nitrogenous compounds.
Plant. Physiology, IV A , *379-386.*

- STEWARD (F.C.) et POLLARD (J.K.) - (1957)
Nitrogen metabolism in plants : ten years in retrospect.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 8 , *65-114.*

- STEWART (J.) - (1963)
Determination of ornithine, lysine, arginine, citrulline and histidine.
J. Chromatog., 10 , *404-407.*

- SVOBODA (G.H.) - (1964)
The methodology of selective extraction and gradient pH extraction techniques.
LLoydia, 27 , *229-301.*

- TAKAI (N.) SENO (M.) et YAMABE (T.) - (1965)
The group separation of amino acid with ion exchange membranes.
Kogyo Kagatu Zasshi, 68 , *415-416 et C.A. (1965)* 63 , *242I.*

- TEMPE (J.) - (1966)
Analyse des acides aminés par chromatographie. I. Considérations générales sur l'intégration des pics. Une méthode rapide d'intégration mannuelle.
J. Chromatog., 24 , *169-174.*

- TEUWISSEN (B.), LENAIN (C.), DORLET (C.) et LEONIS (J.) - (1963)
J. Pharm. Belg., 18 ; *413-418.*

- TSCHIERCH (B.) - (1962)
Pharmazie, 17 , *721-730.*

- VAN STEKELENBURG (G.J.) et DESPLANQUE (J.) (1966)
Deproteination by ultrafiltration with centrifugal force.
Techniques in amino acid analysis.
Technicon monograph n° 1, 51-60.

- VERZAR-PETRI (G.) - (1963)
Connection of alkaloid formation with plant metabolism.
Gyogyszereszet, 7 , *441-447 (d'après C.A.).*

- VESELA (I.V.) - (1964)
Polarographic determination of amino acids.
Ukr. Khim. Zh., 30 , *398-402. (d'après C.A.).*

- VIGNERON (M.) - (1960)
Determination par titrage potentiométrique de l'azote aminé libre de quelques amino-acides, peptides et protéines.
Ann. Pharm. Fr., 18 , *404-423.*

- VIRTANEN (A.I.) - (1957)
Festschr. Arthur Stoll. 565-581. (d'après C.A.).

- VISHIN (M.L.) et RAZDAN (B.K.) - (1962)
Amino acids in the berries of Ephedra foliata.
Proc. Rajasthan Acad. Sci., 9 , *45-48.*
(d'après C.A.).

- VON ARX (E.) et NEHER (R.) - (1963)
Eine multidimensionale Technik sur Chromatographischen Identifiziernug von Aminosaüren.
J. Chromatog., 12 , *329.*

- VON DEBSKA (M.) et KACZMAREK (F.) - (1959)
Papier chromatographische - Trennung von Vincamin und Isovincamin.
Planta medica, 3 , *241-244.*

- VOSKOBOINIK (S.L.) - (1961)
Vipan-a periwinkle preparation.
Farm. Zhur., 16 , *47-50 (d'après C.A.).*

- WETLAUFER (D.B.) - (1962)
Ultraviolet spectra of proteins and amino acids.
Adv. Protein Chem., 17 , *303-390.*

- WEYERS (J.) et SKORA (M.) - (1962)
Determination of some alkaloids by means of a photocolorimetric method using Reinecke salt.
Dissertations Pharm., 14 , *201-205.*

- WIERZCHOWSKI (P.) et KRUZE (D.) - (1964)
Combined colunn - paper chromatography.II - A new system of solvents for the chromatographic separation of amino acids.
J. Chromatog., 14 , *194-200.*

- WIESNER de O'HANNA (R.) - (1963)
Potentiometric titration of amino acids in a nonaqueous medium.
Rev. Fac. Farm. Univ. Central. Venezuela, 4 , *81-100 (d'après C.A.).*

- WINTER (E.) - (1960)
Uber Vorkommen und Ents tehungsbedigungen des Farbstoffes Intybin.
Planta, 54 , *326-332.*

- WINTER (L.N.) et ALBRO (P.W.) - (1964)
J. Gas chromatog., 2 , *1-6.*

- WITTMANN (H.) - (1964 et 1965)
New reagents for the paper chromatographic detection of amino acids.
Monatxch. Chem., 95 , *1198-1200 et* 96 , *523-526 (d'après C.A.).*

- WOLLISH (E.G.) - (1961)
Present status of thin-layer chromatography.
Microchemical Techniques, 687-696.

- WOZNIAK (W.) MURAWSKA (B.) et WERAKSO (B.) (1965)
A microbiological method for determining glutamic aspartic acids.
Acta Polon. Pharm., 22 , *191-194 (d'après C.A.).*

- YANKOV (S.I.) - (1963)
Comparative studies of the amino acid composition of wheat and corn germs.
Nanchin Tr., Vissh Inst. Khranitelna Vkusova Prom.
Proc. Rajasthan acad. Sci., 9 , *45-48 (d'après C.A.).*

- YA PIN LEE et TAKAHASHI (T.) - (1966)
An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin.
Anal. Biochem., 14 , *71-77.*

- YEMM (E.W.) - (1965)
The respiration of plants and their organs.
Plant. Physiol., IV A , *231-310.*

- ZULALIAN (J.), FISCHER (A.G.) et SUHADOLNIK (R.J.) (1964)
Importance of transport in alkaloid biosynthesis.
J. Albert Einstein Med. Center, 12 , *63-70*
(d'après C.A.).

D E U X I E M E T H E S E

ASPECTS ANATOMIQUES ET CHIMIQUES DE LA CLASSIFICATION DES APOCYNACEES

VU,
Le Président de Thèse
signé :

N° 72

VU, le 24-5-1968
Le Doyen
Signé :

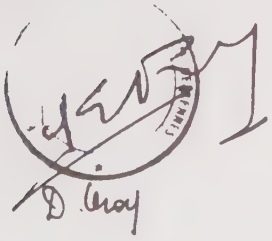


TABLE DES MATIERES

pages

- INTRODUCTION : 1

- MATERIEL VEGETAL UTILISE, RECOLTE ET CONSERVATION. 7

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES ACIDES AMINES

CHAPITRE I : ETUDE QUALITATIVE.

- TRAVAUX ANTERIEURS. 13
- TRAVAUX PERSONNELS. 16

A) Choix des techniques.

I. Essais de différentes méthodes d'extraction, de purification et de séparation par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince et sur papier. 17

2. Méthode choisie. 27

Extraction et purification.
Séparation des différents acides aminés des végétaux en trois groupes par électrophorèse préparative (BISERTE 1958). 31

Séparation des acides aminés dans chaque groupe, par électrochromatographie sur papier. 43

B) Application aux Vinca.

I. Techniques utilisées et acides aminés caractérisés dans les trois espèces et leurs différents organes. 55

2. Conclusions. 68

CHAPITRE II : ETUDE QUANTITATIVE.

- TRAVAUX ANTERIEURS. 72
- TRAVAUX PERSONNELS. 81

A) Choix des techniques.

I. Extraction. 81

2. Dosages. 81

B) Résultats.

I. Choix de l'heure des prélèvements. 86

2. Utilisation de l'Autoanalyseur Beckman.

Dosages des différents acides aminés au cours de la végétation dans les feuilles du *Vinca minor* et du *Vinca major* pendant les années 1965 et 1966. 88

3. Utilisation de l'Autoanalyseur Technicon.

Dosages des différents acides aminés au cours de la végétation dans les feuilles, les fleurs et les racines du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media* pendant les années 1966 et 1967. 116

4. Conclusions. 143

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES ALCALOIDES

CHAPITRE I : ETUDE QUALITATIVE.

- TRAVAUX ANTERIEURS. 147
- TRAVAUX PERSONNELS. 151

A) Choix des techniques.

I. Extraction. 151

2. Séparation de groupes d'alcaloïdes par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince. 153

B) Application aux Vinca.

I. Séparation de groupes d'alcaloïdes dans les feuilles, les tiges, les racines et les fleurs du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media*. 155

2. Conclusions. 157

CHAPITRE II : ETUDE QUANTITATIVE.

- TRAVAUX ANTERIEURS. 173
- TRAVAUX PERSONNELS. 176

A) Choix des techniques.

I. Extraction. 176

2. Dosages. 176

B) Résultats.

I. Dosages des alcaloïdes totaux au cours de la végétation dans les feuilles, les tiges, les racines et les fleurs du *Vinca minor*, du *Vinca major* et du *Vinca media* pendant les années 1964, 1965, 1966 et 1967. 188

2. Conclusions. 190

TROISIEME PARTIE

COMPARAISON DES RESULTATS DES DOSAGES DES ACIDES AMINES ET DES ALCALOIDES TOTAUX AU COURS DE LA VEGETATION DANS LES FEUILLES, LES FLEURS ET LES RACINES DU *VINCA MINOR*, DU *VINCA MAJOR* ET DU *VINCA MEDIA* PENDANT LES ANNEES 1966 et 1967. 220

CONCLUSIONS GENERALES 243

BIBLIOGRAPHIE 257

DEUXIEME THESE

ASPECTS ANATOMIQUES ET CHIMIQUES DE LA CLASSIFICATION DES APOCYNACEES. 292